SEROLOGISCHE FEINSTRUKTURANALYSE DES HAUPTHISTOKOMPATIBILITÄTS KOMPLEXES (H-2) DER MAUS MIT MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

HEINZ-PETER VOLLMERS

aus Stade

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548919_0048

Serologische Feinstrukturanalyse des Haupthistokompatibilitäts Komplexes (H-2) der Maus mit monoklonalen Antikörpern

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
HEINZ-PETER VOLLMERS
aus Stade

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	12. November 1981
Dekan:	Professor Dr. W.-U. Schnitzler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. D. Götze
2. Berichterstatter:	Professor Dr. W. Seyffert

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Immungenetik, Tübingen, durchgeführt.

Herr Prof. Dr. D. Götze gab die Anregung zur Bearbeitung des Themas. Er führte die Betreuung der Arbeit durch und half mit wertvollen Ratschlägen und steter Bereitschaft zur Diskussion der Ergebnisse. Die zahlreichen Verbindungen des Instituts zu namhaften in- und ausländischen Wissenschaftlern gaben mir die Gelegenheit zu weiteren direkten Diskussionen.

Die Max-Planck-Gesellschaft und die Deutsche Forschungsgemeinschaft übernahmen die Förderung der Arbeit.
Herr Prof. Dr. J. Klein stellte den Arbeitsplatz zur Verfügung.

Herr Dipl. Biol. S. Singh war in maßgeblicher Weise an der Durchführung der biochemischen Versuche beteiligt. Herr K. Lamberty führte die Zeichnungen aus, Frau E. Illgen übernahm die Foto- und Frau R. Franklin die Schreibarbeiten.

Herr Dr. E. Wakeland, Herr Dr. J. Nadeau, Herr Dr. C. M. Huang, Herr Dipl. Biochem. B. Arden, Frau L. Hofmann, Frau J. Peuker, Frau L. Yakes und Herr S. Forster haben die täglichen Probleme hilfreich mitgetragen.

Ihnen allen danke ich herzlich.

In dieser Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

BSA: Bovine serum albumin, cDNS: complementäre Desoxyribonukleinsäure, Con A: concanavalin A, C4: Komplement-Komponente 4, C4b: Komplement-Komponente C4b, C4 Bp: C4 Bindungsprotein, cpm: counts per minute, CT Test: Zytotoxischer Test, DMEM-Medium: Dulbeccos Modified Eagles Medium, DNS: Desoxyribonukleinsäure, EDTA: Äthylendiamintetraessigsäure, FCS: Fötales Kälberserum, h: Stunden, HAT-Medium: Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin Medium, H-2: Histocompatibility-2, LPS: Lipopolysaccharid, MHC: Major Histocompatibility-2 Complex, MLR: Mixed Lymphocyte Reaction, min: Minuten, MW: Molekulargewicht, NMS: Normales Mäuse Serum, Np-40: Nonidet P40, PBS: Phosphate-Buffered Saline, PEG: Polyäthylenglycoll, PVP: Polyvinylpyrrolidon, Ramig: Rabbit anti Maus Ig Antiserum, RNS: Ribonukleinsäure, rpm: rounds per minute, RT: Raumtemperatur, SDS: Natrium-dodecyl-sulfat, sec: Sekunden, Slp: Sex-limited protein, SRB: Standard Running Buffer, Ss: Serum substance, Staph A: Staphylococcus aureus, TEMED: M-N,N,N'-tetramethyl-athylen-diamin, Tris: Tris-(hydroxymethyl)aminomethan.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1.	MATERIAL	12
2.1.1.	Mäuse	12
2.1.2.	Chemikalien und Plastikartikel	12
2.1.3.	Antiseren	13
2.1.4.	Monoklonale Antikörper	14
2.1.5.	Komplement	16
2.1.6.	Komplementkomponenten	16
2.1.7.	Polyäthylenglykoll	16
2.1.8.	Zellen	16
2.1.9.	Medien	17
2.2.	METHODEN	18
2.2.1.	Immunisierungen	18
2.2.2.	Immunisierungen für Fusionen 47, 102 und 112	18
2.2.3.	Fusionsprotokoll	19
2.2.4.	Selektion der Zellhybride im HAT-Medium	21
2.2.5.	Reklonierung von Hybridzellen	22
2.2.6.	Aszites	23
2.2.7.	Einfrieren von Zellen	23
2.2.8.	Auftauen von Zellen	24
2.2.9.	Zytotoxischer Test	24
2.2.10.	Absorptionen	25
2.2.11.	Quantitative Absorption	26
2.2.12.	Immundiffusion	26

		Seite
2.2.13.	Hämagglutinationstest	27
2.2.14.	Inhibition der PVP-Hämagglutinations-aktivität	28
2.2.15.	Entfernen von Antigenen von der Zell-oberfläche	28
2.2.16.	Readsorption	29
2.2.17.	Normales Mausserum und Plasma	29
2.2.18.	Reinigung von Serum und Plasma	29
2.2.19.	Affinitätschromatographie	30
2.2.20.	Spezifische Reinigung von Kaninchen anti-Maus-Serum	30
2.2.21.	Iodierung	31
2.2.22.	Radioimmunoassay	32
2.2.23.	Inhibition der Antikörper im Radio-immunoassay	
2.2.24.	Reinigung von T-Zellen über Nylonwolle	32
2.2.25.	Reinigung von B-Zellen	33
2.2.26.	Stimulierung von T-Zellen mit Concanavalin A	34
2.2.27.	Stimulierung von B-Zellen mit Lipopoly-saccharid	34
2.2.28.	Gemischte Lymphozyten Reaktion	34
2.2.29.	Bestimmung des Stimulationsindex	34
2.2.30.	Makrophagenkultur	35
2.2.31.	In vitro Markierung	36
2.2.32.	Indirekte Immunpräzipitation	36
2.2.33.	Antigen Präparation	37
2.2.34.	Lectin Affinity Chromatographie	38
2.2.35.	Herstellung von Protein A aus Staphylococcus aureus Kulturen	38

		Seite
2.2.36.	Fixierung	39
2.2.37.	Ammoniumsulfatfällung	39
2.2.38.	SDS-Polyacrylamid Elektrophorese	40
2.2.38.1.	Puffer und Lösungen	40
2.2.38.2.	Trenngel	40
2.2.38.3.	Sammelgel	41
2.2.38.4.	Flachgelelektrophorese	41
2.2.38.5.	Elektrophorese in Röhrchen-Gelen	41
3.	ERGEBNISSE	43
3.1.	H-2K Region	43
3.1.1.	Reaktivität gegen unabhängige Inzucht- und rekombinanten Mäuselinien	43
3.1.2.	Reaktivität mit Gewebe von B10.W Linien	43
3.1.3.	Absorptionen	48
3.1.4.	Checkerboard-Absorptionen	48
3.1.5.	Kopräzipitation	51
3.1.6.	Diskussion	57
3.2.	S-D Region	63
3.2.1.	Zytotoxische Test gegen Zellen von unabhängigen Inzuchtmäuselinien	63
3.2.2.	Zytotoxischer Test gegen Lymphozyten von rekombinanten Inzuchtmäuselinien	65
3.2.3.	Zytotoxischer Test gegen Lymphozyten von 31 B10.W Linien	68
3.2.4.	Diskussion	71
3.3.	I und H-2D Region	78
3.3.1.	Zytotoxitäts- und PVP-Hämagglutinations-	78

		Seite
	test gegen Lymphozyten und Erythrozyten von unabhängigen und rekombinanten Inzuchtmäuselinien	
3.3.2.	Zytotoxischer und PVP-Hämagglutinationstest gegen Lymphozyten und Erythrozyten von B10.W Linien	81
3.3.3.	Diskussion	84
3.4.	S Region: C4b	87
3.4.1.	Reaktivität der monoklonalen Antikörper mit Zellen von Inzucht- und kongenen Mäuselinien	87
3.4.2.	Absorption	93
3.4.3.	Gewebeverteilung der Determinanten	93
3.4.4	Präsenz der Antigene in Serum und Plasma	93
3.4.5.	De- und Readsorption der Determinanten von Zellen	101
3.4.6.	Beziehung zwischen den Antigenen im Serum und den Ss- Molekülen	104
3.4.7.	Inhibition mit C4b und C4 Bindungsprotein	106
3.5.	S Region: C4 Bindungsprotein	108
3.5.1.	Reaktivität mit Inzucht- und kongenen Mäuselinien	108
3.5.2.	Absorptionen	114
3.5.3.	Gewebeverteilung der Determinante	114
3.5.4.	Präsenz der Determinante in Serum und Plasma	120
3.5.5.	De- und Readsorption der Determinanten von Erythrozyten	120

		Seite
3.5.6.	Beziehung zwischen der Determinante und Ss-Molekülen	123
3.5.7.	Inhibition mit gereinigtem C4 Bindungsprotein	126
3.5.8.	Diskussion: S Region	126
4.	ZUSAMMENFASSENDE BESPRECHUNG	132
5.	LITERATURVERZEICHNIS	137

1. Einleitung

Um das bei der Übertragung von Tumoren von einem Mausstamm auf einen anderen beobachtete Phänomen der Tumor-Resistenz (Abstoßung) zu erklären, postulierte Haldane 1933 (1), daß Gewebe Merkmale tragen, die individual-spezifisch sind: Wird Gewebe von einem Individuum (Spender) auf ein anderes übertragen (Empfänger), so erkennt der Empfänger diese Merkmale, die sich von seinen eigenen unterscheiden, und das Gewebe wird abgestoßen. Tatsächlich konnte P.A. Gorer wenige Jahre später solche Merkmals-Unterschiede an Erythrozyten von verschiedenen Mausstämmen nachweisen (2). Mit Hilfe von Kaninchen-Antiseren, die er gegen rote Blutzellen von verschiedenen Mausstämmen hergestellt und mit Gewebe verschiedener Mausstämme absorbiert hatte, konnte er vier verschiedene Merkmale, Antigene I, II, III und IV, an Erythrozyten unterscheiden. Bei nachfolgenden Untersuchungen über mögliche Zusammenhänge zwischen Empfänglichkeit bzw. Resistenz eines Mausstammes gegenüber Tumoren eines anderen Mausstammes und den serologisch nachweisbaren Merkmalen konnte er in Zusammenarbeit mit Snell tatsächlich feststellen, daß eine Korrelation zwischen Abstoßung und unterschiedlichem Antigen II zwischen Spender und Empfänger bestand (3). Snell nannte die Gene, die die Ausprägung von Merkmalen (Antigenen) kontrollierten, die eine Gewebsabstoßung zwischen Spender und Empfänger verursachten, HISTOKOMPATIBILITÄTS-Gene (H Gene); das Antigen II-kontrollierende Gen erhielt den Namen H-2 (4).
Weitere Untersuchungen über Transplantat-Resistenz von Mausstämmen ließen Snell sehr bald erkennen, daß neben dem H-2 Gen noch andere Histokompatibilitätsgene für die Gewebsabstoßung verantwortlich waren; die Abstoßung von Gewebe bei

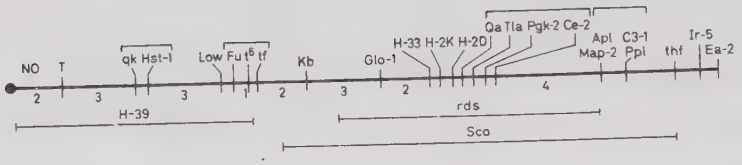


Abbildung 1. Genetische Karte des 17. Chromosoms. Die Loci, von links nach rechts, sind centromere (●), brachyury (T), quaking (qk), hybrid sterility-1 (Hst-1), low (Low), fused (Fu), anury (t^6), tufted (tf), histocompatibility-39 (H-39), knobbly (Kb), kidney catalase (Ce-2), histocompatibility-33 (H-33), histocompatibility-2K (H-2K), histocompatibility-2D (H-2D), Q antigen (Qa), thymus-leukemia antigen (Tla), phosphoglycerate kinase-2 (Pgk-2), retinal degeneration-slow (rds), plasma protein (Plp), complement component 3-1 (C3-1), scopalamine modification of exploratory activity (Sco), acid phosphatase-liver (Apl), glyoxylase-1 (Glo-1), α-mannosidase processing-2 (Map-2), thin fur (thf), immune response-5 (Ir-5), erythrocyte antigen-2 (Ea-2). Klammern bedeuten, daß die Folge der Loci innerhalb der Klammer nicht bekannt ist, Segmente bedeuten, daß der Locus nicht genau kartiert ist und innerhalb der Grenzen eines Segmentes liegen kann.

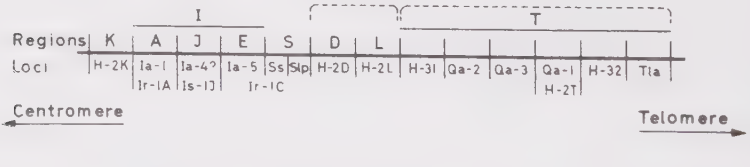


Abbildung 2. Genetische Karte des H-2 Komplexes. Klammern bedeuten, daß die Folge der Loci innerhalb der Klammer nicht bekannt ist.

allelen Unterschieden für diese Gene zwischen Spender und Empfänger setzte allerdings später ein und nahm einen protrahierten Verlauf (nach drei oder mehr Wochen über mehrere Tage) als die Abstoßung, die bei allelen Unterschieden zwischen Spender und Empfänger für das H-2 Gen beobachtet wurde (innerhalb von zwei Wochen in wenigen Tagen). Das H-2 Gen wurde deshalb von Snell "Major Histocompatibility Gene" (Haupthistokompatibilitätsgen), und alle anderen "Minor histocompatibility genes" genannt (5). Histogenetische und serologische Untersuchungen deckten dann bald auf, daß es sich bei dem H-2 Gen nicht nur um einen Locus handelte, sondern um einen Komplex von mehreren eng gekoppelten Genen: Major Histocompatibility-2 Complex, MHC (8, 9, 10).

Der Haupthistokompatibilitäts-2 Komplex

Der Haupthistokompatibilitäts-2 Komplex befindet sich auf dem 17. Chromosom (Abb. 1) und nimmt eine Länge von 0,5 bis 1,5 Zentimorgan ein, je nachdem, welche Loci dem Komplex zugerechnet werden: Ursprünglich wurde der H-2 Komplex als das Chromosomen-Segment definiert, das sich zwischen dem zentromer-nahen H-2K Locus und dem telomeren H-2D Locus erstreckt. Untersuchungen der letzten Jahre haben allerdings ergeben, daß rechts vom H-2D Locus mehrere Loci Zellmembranstrukturen ausprägen, die funktionell und biochemisch einigen H-2 Genprodukten ähnlich sind; man kann sie daher dem H-2 Komplex zurechnen.

Der ursprüngliche H-2 Komplex besteht aus mindestens vier Regionen (K, I, S, D), wobei man in der I-, S- und D-Regionen mehrere Loci unterscheiden kann (Abb. 2). Die Produkte dieser

Gene kann man serologisch, biochemisch und funktionell in mehrere Klassen einteilen:

Zur Klasse I gehören die Produkte der Gene H-2K, H-2D und H-2L; man kann sie serologisch an der Membran (fast) aller Zellen eines Organismus nachweisen. Sie stellen Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 44 000 Dalton dar und sind mit beta-2 Mikroglobulin nicht-kovalent assoziiert (11, 12). Funktionell spielen sie eine Rolle bei der Initiierung der Immunantwort von zytotoxisch wirkenden Lymphozyten gegen virus-infizierte Zellen (13).

Zur Klasse II gehören die Produkte der Gene der I Region, I-A und I-E: Diese lassen sich serologisch nur an einem Teil der Lymphozyten (B-Lymphozyten, aktivierte T-Lymphozyten) und Makrophagen nachweisen, nicht aber an anderen Zellen eines Organismus. Biochemisch sind sie membrangebundene Glykoproteine, die aus zwei nicht-kovalent gekoppelten Polypeptid-Ketten bestehen (α: 35 000 Dalton und β: 28 000 Dalton). Funktionell spielen sie bei der Aktivierung von T-Helfer-Zellen durch Makrophagen bei der primären Immunantwort einen entscheidenden Einfluß (13-19).

Zur Klasse III gehören die Produkte der S Region Gene: Ss und Slp. Serologisch können diese Moleküle an einem Teil der Lymphozyten, an Erythrozyten, an Makrophagen und im Serum nachgewiesen werden. Beide Moleküle, Ss und Slp, haben ein Molekulargewicht von 200 000 Dalton und bestehen aus drei Polypeptid-Ketten α (95 000 Dalton), β (70 000 Dalton) und γ (30 000 Dalton). Das Ss Molekül stellt die C4-Komponente des klassischen Komplementsystems dar; Slp scheint eine inaktive Form von C4 zu sein (20-28).

Das (die) Produkt(e) der I-J Region lassen sich bisher keiner der drei Klassen zuordnen, da sie serologisch nur ungenügend

und biochemisch gar nicht charakterisiert werden konnten. Funktionell wirken sie suppressiv auf die Immunantwort und scheinen auf einer Subpopulation von T-Zellen, Suppressor-T-Zellen, ausgeprägt zu sein (29-31).

Der MHC weist mehrere Besonderheiten auf, die ihn von fast allen anderen genetischen Systemen unterscheiden:

1. Die von den Genen des MHC ausgeprägten Moleküle weisen eine sehr starke serologische Komplexität auf;
2. die Gene des MHC kommen in äußerst zahlreichen Allelen vor, d.h., das System ist außerordentlich polymorph.

Diese beiden Eigenschaften stehen in einem gewissen Gegensatz zu der beobachteten Stabilität und des Konservativismus, den der MHC in Wild-Maus-Populationen aufweist.

Serologische Komplexität

Die Zellmembran-gebundenen Glykoproteine der MHC Gene können mit serologischen Methoden nachgewiesen werden, d.h., mit Antiseren. Diese Antiseren werden in H-2-Rekombinanten-Kombinationen hergestellt, die sich nur für einzelne Regionen des MHC unterscheiden. Solche Antiseren reagieren normalerweise nicht nur mit den Zellen des zur Immunisierung verwendeten Stammes, sondern auch mit Zellen anderer, unverwandter Mausstämme, d.h., mit solchen Mausstämmen, die MHC Allele besitzen, die sich von denen des Empfängers und Spenders unterscheiden. Durch Absorption des Antiserums mit Gewebe dieser "kreuzreagierenden" Mausstämme, kann man erreichen, daß es nur noch mit dem Gewebe des zur Immunisierung verwendeten Stammes reagiert. Diese verbleibende Aktivität wird durch sogenannte "private Antigene" vermittelt (32), die innherhalb einer begrenzten Zahl von Inzucht-Stämmen

Tabelle 1. H-2 Karte der Inzuchtlinien mit den privaten und publiken Determinanten, die vom H-2K Locus codiert werden

Allel	Private Determinante	Publike Determinanten
b	33	5,27,28,35,39,46
d	31	3,8,27,28,29,34,46,47
f	26	7,8,27,28,29,37,39,46
k	23	1,3,5,8,11,25,46,47
p	16	1,5,7,8,34,37,38,46
q	17	1,3,5,11,34,45
s	19	1,5,7,42,45
u	2o	5,8,35,36,45
v	21	1,3,5,45
r	18	1,3,5,8,11,25,45,47
j	15	1,7,38,45

als allel-spezifisch gewertet werden können. Die von dem Antiserum erkannten Antigen-Determinanten, die an Zellen von Mausstämmen mit zum Spender unterschiedlichem MHC-Allel nachgewiesen werden, werden "publike Antigene" genannt. Innerhalb eines begrenzten Inzucht-Panels ist also ein Allel-Produkt durch ein privates Antigen definiert und durch eine Kombination von publiken Determinanten mit einem privaten Antigen charakterisiert (Tabelle 1). Werden Mäuse, die nicht zum Inzuchtpanel gehören (Wild-Mäuse), mit solchen Antiseren getestet, die durch Absorption spezifisch für eine privates Antigen sind, zeigen sich zusätzliche "Kreuzreaktionen", d.h., private Antigene setzten sich aus mehr als einer Determinante zusammen, die durch Ausweitung des Testpanels differenziert werden können. Für die 11 am häufigsten benutzten Inzuchtstämme sind 18 private H-2K und H-2D Antigene und ca. 40 publike Determinanten bekannt.
Das Produkt einer MHC Region besitzt also eine Vielzahl von Antigen-Determinanten, die in vielfacher Kombination vorkommen können. Dabei treten einige Determinanten sehr häufig in unterschiedlichen Kombinationen auf (publike Determinanten), während andere eine seltene Häufigkeit aufweisen (private Determinanten).

Polymorphismus

Bei Untersuchungen von Wildmäusen hat man gefunden, daß Klasse I Gene (H-2K, H-2D) in wahrscheinlich weit über hundert Allelen auftreten (33-41). Neben dieser ungewöhnlich hohen Zahl von Allelen ist der Befund überraschend, daß alle diese Allele mit einer annähern gleichen Häufigkeit von 0,01 oder weniger auftreten. Klasse II Gene scheinen

nicht das gleiche Ausmaß an Vielfältigkeit aufzuweisen, jedoch kann man aus den Analysen von Wildmäusen schließen, daß auch diese Gene mindestens vierzig bis sechzig Allele aufweisen (36, 38).

Alle diese Allele der Klasse I und Klasse II Gene haben phänotypisch die einen oder anderen publiken Determinanten gemeinsam, unterscheiden sich aber in ihren privaten Antigenen - oder etwas anders ausgedrückt: es scheint so, daß man bei allen Allelen gleiche Determinanten nachweisen kann, nur die Komposition der Determinanten ist für jedes Allele unterschiedlich (42-44).

Die Produkte der Klasse III Gene (Ss, Slp = C4) weisen zwar serologisch nur eine geringe Variabilität aus (45), jedoch kann man auch hier mit biochemischen Methoden - Peptid-Auftrennung und zweidimensionale Gelelektrophorese - nachweisen, daß alle drei Ketten Variationen aufweisen (46-48); auch hier besteht also ein Polymorphismus, dessen Ausmaß jedoch geringer erscheint als für Klasse I und II Gene.

Stabilität und Konservativismus

Die außerordentliche serologische Komplexität der MHC-Moleküle, der eine strukturelle Variabilität zugrunde liegt, und die Vielfalt der anscheinend gleichwertigen Allele sollten vermuten lassen, daß es sich bei dem MHC um ein stark veränderliches System handelt. Man hat diese Diversität in Zusammenhang mit der vermuteten Funktion des MHC gebracht: MHC-Genprodukte dienen dem Immunsystem zur Unterscheidung von SELBST und NICHT-SELBST (49, 50). Das Immunsystem erkennt und reagiert auf NICHT-SELBST (Pathogene) nur bei gleichzeitiger Erkennung von SELBST. Pathogene, die eines

Individuums "SELBST" nachahmen, können von dem Immunsystem nicht als "FREMD" erkannt werden; es reagiert daher nicht. Damit diese Situation für die Gesamt-Population vermieden wird, entstehen in Anpassung an eine sich verändernde Umwelt immer neue Allele ("adaptive Diversifikation").
In offensichtlichem Widerspruch zu dieser Hypothese der "Erzeugung von Vielfältigkeit" stehen einige in jüngster Zeit erhobene Befunde: Man findet serologisch und biochemisch identische Allele in geographisch weit auseinanderliegenden und seit Jahrhunderten getrennten Populationen (51) und Mäuse mit einer sogenannten t-Mutation (52), die einmal eine H-2-Rekombinations-Suppression und zum anderen eine Segregations-Distortion zugunsten der Mutation und des damit gekoppelten MHC bewirkt, besitzen identische MHC Allele unabhängig davon, wo sie gefunden werden. Dies deutet daraufhin, daß das gleiche Allel Jahrhunderte unter den verschiedensten Umwelt-Einflüssen ohne Veränderungen überstanden hat, d.h., keine "adaptive Diversifikation" (z.B. durch Mutation) stattgefunden hat.
Es bleibt also das Phänomen, daß hier Gene vorliegen, die einerseits eine außergewöhnlich hohe Variabilität aufweisen, aber gleichzeitig eine bemerkenswerte Stabilität in der Erhaltung von Allelen besitzen. Diese Kombination erscheint schwerlich vereinbar.

Multiples Gen-Modell

Eine Möglichkeit, den oben aufgezeigten Widerspruch zu lösen, ist die Hypothese, daß es sich bei den bisher serologisch nachgewiesenen Gen-Produkten nicht um jeweils ein Glykoprotein, und damit um ein Gen, handelt, sondern um mehrere Glykoproteine,

die von mehreren Genen kontrolliert werden, die sehr eng aneinander gekoppelt sind. Rekombinanten in Inzuchtstämmen wären daher sehr selten zu finden, und Antiseren, die in Kombinationen hergestellt werden, die sich scheinbar nur für ein Gen des MHC unterscheiden, unterscheiden sich in Wirklichkeit in einer Reihe von Genen, die jedes für sich ein etwas unterschiedliches Glykoprotein ausprägen; die Antiseren enthalten daher auch eine sehr heterogene Anzahl von Antikörpern mit unterschiedlicher Spezifität. Die Differenzierung dieser Antikörper ist im Rahmen der vorhandenen zehn bis zwölf Inzuchtstämmen mit unterschiedlichem MHC jedoch nicht möglich, d.h., der Phänotyp erscheint von einem Gen kontrolliert. Bei Ausdehnung der Analysen auf Wildmaus-Populationen sollte diese Differenzierung allerdings möglich sein - ist aber wegen der geschilderten Komplexität des MHC wie auch der Reagenzien praktisch kaum durchführbar. Die beobachtete Kombination von Variabilität einerseits und Konservativismus andererseits, könnte mit diesem Modell leicht erklärt werden: Jedes dieser eng gekoppelten Gene besitzt nur eine geringe Zahl von Allelen, die frei rekombinierbar sind: so könnten die bisher angenommenen um die hundert H-2K-Phänotypen auch durch die Kombination von drei Genen mit jeweils 4 bis 5 stabilen Allelen zustande kommen. Hinweise, daß die serologische Komplexität und der extreme Polymorphismus von MHC-Regionen tatsächlich eher durch eng gekoppelte Gene verursacht sein könnte als durch ein hoch polymorphes Gen, sind die Befunde von Démant et al. und Hansen et al., die auf Grund einer Mutation in der H-2D Region nachweisen konnten, daß Determinanten des H-2D "Locus" tatsächlich von zwei Genen kontrolliert werden (H-2D

und H-2L-Locus, 53-57).

Ziel der vorliegenden Arbeit

Zwei Entwicklungen des letzten Jahrzehnts sollten es möglich machen, die oben dargelegte Hypothese experimentell zu prüfen: Jan Klein hat systematisch Wildmaus-abgeleitete MHC-Genotypen in Inzuchtstämme eingekreuzt, so daß uns heute zu den schon vorhandenen 11 zusätzliche 30 unterschiedliche MHC-Genotypen (B10.W-Stämme, natürliche Rekombinanten) zur Analyse zur Verfügung stehen (33-35). Sollte der MHC tatsächlich aus noch mehr Genen als bisher bekannt zusammengesetzt sein, so sollte es mit geeigneten serologischen Reagenzien möglich sein, deren Produkte voneinander abzugrenzen.
Die Herstellung geeigneter Reagenzien ist seit den Versuchen von G. Köhler und C. Milstein möglich, denen zum erstenmal gelungen war durch Fusion von Myelomzellen mit spezifische Antikörper sezernierenden Plasmazellen monoklonale Antikörper zu erhalten (59).
Das Ziel der in der vorgelegten Arbeit dargestellten Untersuchungen war es, mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch mit MHC-Genprodukten reagieren, unter Verwendung von Inzuchtstämmen, von diesen abgeleiteten H-2 Rekombinantenstämmen und B10.W-Stämmen (natürliche Rekombinanten) serologisch und biochemisch Hinweise für das Vorliegen multipler Klasse I und Klasse II Gene in den bekannten H-2 Regionen zu erhalten, sowie die Untersuchung des Polymorphismus von den H-2 gekoppelten Klasse III Genen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Mäuse

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse stammen aus unserer Maus Kolonie, Corrensstr. 42, 7400 Tübingen, von der Versuchsanstalt für Tiere, Lettow Vorbeck Allee 57, 3 Hannover, von den Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine 04609, USA und OLAC Ltd., Shaw's Farm, Blackthorn, Bicester, Oxon, U.K.

2.1.2. Chemikalien und Plastikartikel

Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid von Eastman Kodak, Rochester, New York, USA; Aminopterin, Glycin, Jodessigsäure, Hypoxanthin, Polyäthylenglykoll, Rinder-Serum Albumin, Thymidin von Sigma Chemie GmbH, München; Difco Bacto Agar, Concanavalin A, Lipopolysaccharid von Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA; Tryptic Soy Broth, Dithiothreitol von BIO-RAD Laboratories, München; Dulbecco's Modified Eagle Medium, Foetales Kälber-Serum, Penicillin-Streptomycin, Kanamycin, Hanks BSS, RPMI 1640 Medium, RPMI 1640 Select-Amine Kit von Gibco, Grand Island, New York, USA; Ficoll-Paque mit einer spez. Dichte von d = 1.073 von Pharmacia, Uppsala, Schweden; ^{3}H-Tyrosin, ^{125}Na-Jodid, ^{3}H-Thymidin, ^{14}C-leucin, ^{3}-Leucin von Amersham-Buchler, Braunschweig; 2-Mercaptoäthanol von Fluka AG, Buchs, Schweiz; Nonidet P40, nicht ionisches Detergens, von Bethesda Research, USA; Protein-Testmischung 8, Serva, Heidelberg; rotiszint von Roth, Chem. Fabrik, Karlsruhe; 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan (Pristan) von Ega Chemie, Steinheim/Albuch; Trishydroxymethylamino-

methan (Tris) von Boehringer, Mannheim. Alle nicht aufgeführten Chemikalien lieferte die Firma Merck, Darmstadt. Plastikartikel wurden von folgenden Firmen bezogen: Gewebekulturflaschen, 50 und 250 ml, von Greiner, Labortechnik, Nürtingen; Corning Centrifuge tubes von G. Kästner, Tübingen; Falcon tubes, 12 x 75 mm, 7 x 100 mm, steril mit Kappe, Probenröhrchen, Mikrotestplatten (Terasaki), Mikro Test II, Tissue culture plate, 24 wells, von LS-Labor Service GmbH, Seromed, München; Tissue culture cluster, 24 wells, von Costar, Camb., Mass., USA.

2.1.3. Antiseren

Das Alloantiserum K 309 PPI, das als Kontrollserum in den Adsorptions- und Sheddingexperimenten verwendet wurde, hat die Spezifität H-2.9. Es wurde durch Immunisierung von (DBA/2 x B10.S)F_1 Mäusen mit Zellen von B10.M Mäusen hergestellt.
Das Antiserum gegen das C4 Bindungsprotein wurde freundlicherweise von Dr. S. Sakai und das Lyt 2.2 Antiserum von Dr. Z. Nagy zur Verfügung gestellt.
Die Antiseren gegen Maus Immunoglobuline IgG1, IgG3, IgG2a, IgG2b, IgM, lambda und kappa Leichte Kette wurden von Nordic Laboratories, Tilburg, Niederlande bezogen.
Das Alloantiserum anti Thy-1, das zur Reinigung von B-Lymphozyten verwendet wurde, wurde durch Immunisierung von CBA Mäusen mit AKR Thymozyten hergestellt.
Das Alloantiserum T-76 hat die Spezifität $\underline{H\text{-}2K^k}$ und weist eine Kreuzreaktion mit $\underline{H\text{-}2K^p}$ auf. Es wurde in der Kombination (DBA/2 x A.T_H)F_1 α A.AL hergestellt.
Das Antiserum gegen Ss Moleküle wurde folgendermaßen hergestellt: Serum von DBA/2 Mäusen (Ss^h) wurde über Sephadex

G 200 Säulen gereinigt, die Fraktionen mit Ss Molekülen konzentriert und insgesamt 2 mg Ss Protein subkutan in ein Kaninchen injiziert. Die Immunisierungen wurden viermal im Abstand von 2 Wochen durchgeführt. Nur bei der ersten Immunisierung wurde komplettes Freund's Adjuvans verwendet. Das Kaninchen wurde regelmäßig geblutet und das Antiserum im Ouchterlony Immundiffusionstest gegen Serum von Ss^h Mäusen getestet. Um das Antiserum von Aktivitäten gegen andere Serumkomponenten zu reinigen, wurde es mit Serum von Ss^l Mäusen absorbiert.

Zur Herstellung von Kaninchen anti Maus Ig Antiserum wurden Kaninchen mit durch Ammoniumsulfatfällung gereinigten Maus Immunglobulinen in Abständen von 2 Wochen subkutan viermal immunisiert. Insgesamt wurden 2 mg injiziert, wobei nur bei der ersten Immunisierung komplettes Freund's Adjuvans verwendet wurde. Das Kaninchen wurde regelmäßig geblutet und das Serum im Ouchterlony Immundiffusionstest untersucht.

2.1.4. Monoklonale Antikörper

Der monoklonale Antikörper 119-16.30.34 wurde von Dr. Götze hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde durch Immunisierung von BALB c Mäusen mit Lymphozyten von C3H.NB Mäusen und anschließender Fusion mit NS-1 Myelomzellen produziert.

Die Spezifität ist H-2.16, die private Determinante von $H\text{-}2K^F$, die Antikörperklasse ist IgG2a, κ.

Die anderen monoklonalen Antikörper, die in dieser Arbeit zur serologischen und biochemischen Untersuchung des H-2 Komplexes verwendet wurden, sind in Tabelle 1 aufgeführt. Sie werden im Ergebnisteil in entsprechender Reihenfolge diskutiert.

Tabelle 2. Monoklonale Antikörper, die in dieser Arbeit zur Untersuchung des H-2 Komplexes verwendet wurden

Name	Rezipient	Donor	Antikörper-klasse	Spezifität
[a]47/21-13[f]	(AxB10)F_1	B10.P	IgG2a, κ	K Region
[b]102/4o-7	BALB/cxB10.F(13R)F_1	B10.P	IgG2a, κ	S-D Region
[c]47/42-2	(AxB10)F_1	B10.P	IgG2a, κ	Ia13
[d]47/36-9	(AxB10)F_1	B10.P	IgG1, κ	H-2.22
[d]112/10-19	A.SW	A.CA	IgG1, κ	C4b
[d]112/15-16	A.SW	A.CA	IgG2a, κ	C4b
[d]112/39-2	A.SW	A.CA	IgG1, κ	C4b
[e]112/38-12	A.SW	A.CA	IgG1, κ	C4 Bp

[a]Siehe Kapitel 3.1.

[b]Siehe Kapitel 3.2.

[c]Siehe Kapitel 3.3.

[d]Siehe Kapitel 3.4.

[e]Siehe Kapitel 3.5.

[f]Die Zahl vor dem Querstrich gibt die Nummer der Fusion an (47), die Zahl vor dem Bindestrich benennt den Primärklon (21) und die letzte Zahl bezeichnet den Reklon (13).

2.1.5. Komplement

Als Komplement für den zytotoxistischen Test gegen Milz und Lymphknotenzellen wurde eine Mischung aus Meerschweinchen- und Kaninchenserum, für die Reinigung von B Zellen nur Kaninchenkomplement in einer nicht toxischen Konzentration verwendet.

2.1.6. Komplementkomponenten

Die gereinigten Komplementkomponenten C4b und C4 Bindungsprotein (C4 Bp) wurden freundlicherweise von Dr. F. Figueroa zur Verfügung gestellt.

2.1.7. Polyäthylenglykoll

Als Fusionsagens diente eine 45%-ige PEG-lösung (w/v in DMEM-Medium ohne FCS) (60). Zum Ansetzen der Lösung wurde die gelartige PEG Substanz autoklaviert, verdünnt und bei $4^{o}C$ aufbewahrt.

2.1.8. Zellen

Für die Zellfusionsexperimente wurden die Myelomzellinien P-3-X63-Ag8 (P-3) und NS-1-1-Ag4-1 (NS-1) verwendet, die uns von C. Milstein, Cambridge, zur Verfügung gestellt wurden. Die Zellinie P-3 ist ein BALB/c Plasmacytom und sezerniert einen vollständigen IgG_1 Antikörper mit einer κ-L-Kette, während die Mutante NS-1 nur die κ-L-Kette bildet, aber nicht sezerniert (61, 62). Die Zellen wuchsen in vitro bei $37^{o}C$ mit 10% CO_2 und benötigten als Medium DMEM oder RPMI 1640 mit 15% FCS.

2.1.9. Medien

Die Myelomzellen P-3 und NS-1 wuchsen in DMEM Medium mit L-Glutamin, 0,45% L-Glucose und 2% Natriumbicarbonat, oder in RPMI 1640 mit 3% Natriumbicarbonat. Als Antibiotika wurden den Media Penicillin und Streptomycin (je 100 Einheiten/ml) zugesetzt und die Konzentration an foetalem Kälber-Serum betrug für beide Medien 15%.
Für das HAT-Selektivmedium (63) wurde DMEM oder RPMI 1640 Medium verwendet; es war jedoch auf jeden Fall das Medium, in dem die Myelomzellen vor der Fusion wuchsen. Als zusätzliche Bestandteile enthält das Selektivmedium 10^{-4}M Hypoxanthin, 4 mal 10^{-7}M Methotrexat, 1,6 mal 10^{-5}M Thymidin und 3 mal 10^{-6}M Glycin (63) (Methotrexat ist ein Derivat von Aminopterin und kann ebenfalls zu Zellfusionsexperimenten verwendet werden).

2.2. Methoden

2.2.1. Immunisierungen

Für die Immunisierungen wurden die Zellen, wenn nicht anders erwähnt, in 0,3-0,5 ml PBS-Puffer aufgenommen.
Dieser Puffer enthält 0,001 M $CaCl_2 \cdot H_2O$, 0,0026 M KCl, 0,0014 M KH_2PO_4, 0,00049 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,137 M NaCl und 0,0064 M $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$.

2.2.2. Immunisierungen für Fusionen 47, 102 und 112

Für die Fusion Nr. 47 wurden (A x B10)F_1 Mäuse mit 2 x 10^7 Lymphozyten und Erythrozyten von B10.P Mäusen im Abstand von 3 Wochen intraperitoneal immunisiert. Der Donor (B10.P) und der Rezipient (B10) unterscheiden sich im genetischen Background nicht, jedoch im gesamten H-2 Komplex.

	K	A	J	E	S	D
A:	k	k	k	k	d	d
B10:	b	b	b	b	b	b
αB10.P:	p	p	p	p	p	p
	p	p	p	p	p	p

Nach fünf Immunisierungen wurde eine Maus getötet, die Milz steril entnommen und zur Fusion verwendet.
Für die Fusion Nr. 102 wurden (BALB/c x B10.F(13))F_1 Mäuse mit Lymphozyten und Erythrozyten von B10.P Mäusen immunisiert. Die Injektionen erfolgten mit 10^7 Zellen alle 2-3 Wochen intraperitoneal. Nach 12 Immunisierungen wurde die Fusion 102 durchgeführt. Donor und Rezipient unterscheiden sich genetisch in dieser Kombination nur in der S-D Region des H-2 Komplexes.

	K	A	J	E	S	D
BALB/c	d	d	d	d	d	d
13R	p	p	p	p	b	b
B10.P	p	p	p	p	p	p

Für die Fusion 112 wurden A.CA conA Blasten über Nylon Wolle gereinigt und in A.SW Mäuse injiziert; jeweils 10^7 Zellen intraperitoneal im Abstand von 3 Wochen. A.CA und A.SW unterscheiden sich genetisch nur im H-2 Komplex. A.SW besitzt den Haplotyp $H\text{-}2^s$ und A.CA $H\text{-}2^f$. Der genetische Hintergrund ist in beiden Mäusen identisch.

2.2.3. Fusionsprotokoll

Die Zellfusionstechnik wurde modifiziert nach (60-71). Alle Arbeiten wurden steril durchgeführt, um Kontaminierungen durch Bakterien und Pilze zu vermeiden.
Für die Zellfusion wurde der immunisierten Maus die Milz entnommen, von Fett befreit und die Milzzellen mit einer Spritze und Medium herausgespült. Die Zellsuspension wurde 8 min. bei 1800 rpm zentrifugiert (Hettich Zentrifuge), das Sediment in 2 ml einer 0,83%-igen NH_4Cl Lösung aufgenommen und anschließend 2 min. bei 37°C inkubiert. Durch das NH_4Cl wurden die Erythrozyten der Milz lysiert und dann durch anschließendes zweimaliges Waschen mit DMEM ohne FCS entfernt. Die Zellzahl der gewaschenen Lymphozyten wurde in einer Neubauer Zählkammer bestimmt und dann auf die gewünschte Höhe eingestellt. Die Myelomzellen wurden ebenfalls zweimal mit DMEM ohne FCS gewaschen und dann auf die richtige Zellzahl eingestellt.
Danach wurden die Milz- und Myelomzellen zusammen in einem

Röhrchen 8 min. bei 1800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und zu dem Zellsediment 0,2-0,5 ml einer 45%-igen PEG-Lösung gegeben. Durch leichtes Schlagen gegen den Boden des Röhrchens wurden die Zellen aufgewirbelt. Dies war notwendig, damit alle Zellen Kontakt mit dem Fusionsagens PEG bekamen. Die Zellfusion selbst fand statt, sobald die Zellen für 1,5 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert wurden.

Anschließend gibt man tropfenweise 15-20 ml DMEM ohne FCS zu den Zellen. Dieser Vorgang sollte mindestens 5 min. dauern. Wurde das Medium schneller zu den Zellen gegeben, lysierten sie, da die Membranen durch das PEG stark geschädigt worden sind. Nahm man zum Waschen zu wenig Medium, blieb PEG zurück.

Nach der Zugabe des DMEM ohne FCS wurden die Zellen noch einmal 8 min. bei 1800 rpm zentrifugiert, um, wie schon erwähnt, das PEG auszuwaschen.

Das Sediment mit den fusionierten Zellen wurde anschließend sofort in HAT-Medium aufgenommen und die Zellen auf Gewebekulturplatten verteilt.

Das Zellzahlverhältnis von 10^8 Milzzellen und 10^7 Myelomzellen im Fusionsansatz ergab bei einer Verteilung der Zellen auf 4 Kulturplatten mit je 24 Löchern und einem Volumen von 1-2 ml ungefähr 10^6 Zellen pro Loch, 10^6 Milz- und 10^5 Myelomzellen, was sich als die günstigste Zellzahl für Fusionsexperimente herausstellte.

Nach dem Verteilen der Zellen wurden die Platten in den Brutschrank gestellt und bei 37°C und 10% CO_2 inkubiert.

Nach ungefähr einer Woche erfolgte der erste Mediumwechsel, indem man mit einer Pasteurpipette 1 ml Medium entnahm und die gleiche Menge frisches HAT-Medium wieder dazugab. Das Abnehmen

des Mediums sollte möglichst vorsichtig durchgeführt werden, damit die Zellen, die sich auf dem Boden der Löcher befinden, nicht aufgewirbelt und abgesaugt werden.
Nach 10-14 Tagen, je nachdem, wie schnell die Hybridzellen wuchsen, erfolgte der zweite Mediumwechsel. Zu diesem Zeitpunkt sollten die Zellkolonien bereits makroskopisch als weiße Punkte auf dem Boden der Gewebekulturplatten sichtbar sein.
Der Gewebekulturüberstand konnte jetzt bereits auf Aktivität getestet werden.
Zeigt sich nach 14 Tagen kein Wachstum in den Gewebekulturplatten, ist die Fusion mißlungen, die Zellen sind gestorben.

2.2.4. Selektion der Zellhybride in HAT-Medium

Die Myelomzellen P-3-X63-Ag8 und NS-1-1-Ag4-1 haben durch Mutation das Enzym HRPGT (Hypoxanthin-Guanin-Phospho-Ribosyltransferase) verloren und sind damit resistent gegen 8-Azaguanin (63). Dieser Verlust hat zur Folge, daß die Zellen exogene Purinvorstufen aus dem Medium nicht mehr verwerten können.
Unterbricht man mit Aminopterin oder Methotrexat den endogenen Purin- und Pyrimidinstoffwechsel, so sterben die Zellen, da keine DNS- und RNS-Synthese mehr erfolgen kann (63).
Das HAT-Medium, in dem die Selektion auf fusionierte Zellen erfolgte, enthält dazu Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin und Glycin (69). Das Aminopterin hemmt als Tetrahydrofolsäureanaloges die Methylierung von dUMP zu dTMP im Pyrimidinstoffwechsel durch die Thymidinsynthetase und N^5N^{10} Methylentetrahydrofolsäure, so daß die Zellen exogenes Thymidin benötigen. Glycin ist im Medium, weil endogen die Bildung durch Glycin-

synthetase und N^5N^{10} Tetrahydrofolsäure ebenfalls durch Aminopterin gehemmt wird.
Hypoxanthin wird dem Medium beigegeben, weil, wie schon erwähnt, Formyltetrahydrofolsäure C_1-Donator bei der Purinsynthese ist, und die Dihydrofolatreduktase, die Tetrahydrofolsäure synthetisiert, durch Aminopterin kompetetiv gehemmt wird (63).
Die nicht fusionierten Myelomzellen sterben im HAT-Medium, weil der endogene Stoffwechsel durch Aminopterin gehemmt wird, und die normalen Milzzellen leben unter Kulturbedingungen nicht länger als 10 Tage. Nur die Hybride aus Myelom- und Milzzellen überleben, da die Milzzellen das Enzym HRPGT besitzen und damit exogene Purinvorstufen aus dem Medium aufgenommen werden können (63).

2.2.5. Reklonierung von Hybridzellen

Die Hybridzellen, deren Überstände sich im serologischen Test als positiv erwiesen, wurden sofort rekloniert (61, 62). Dazu wurden die Zellen auf eine Zellzahl von 10 Zellen/ml eingestellt, in DMEM oder RPMI 1640 mit 15% FCS aufgenommen und so auf Gewebekulturplatten mit 96 Löchern verteilt, daß sich in den meisten Löchern eine Hybridzelle befand. Die Löcher haben ein Volumen von etwa 0,1 ml. Im Mikroskop wurde die Verteilung der Zellen überprüft und alle Löcher mit mehr als einer Zelle oder keiner ignoriert. Da die Zellen so vereinzelt nicht wachsen würden, gab man Stimulator-, "Fütterzellen", zu den Hybridzellen. Dazu nahm man Milzzellen von Mäusen, etwa 10^5 Zellen für jede Hybridzelle. Die "Fütterzellen" wurden mit 3000 R bestrahlt, so daß sich die Zellen selber nicht mehr teilten, nach einer Woche starben und es

außerdem nicht zu einer zellulären Reaktion kommen konnte, falls keine syngenen Mäuse vorhanden waren.
Das Reklonieren hatte zwei wichtige Gründe: Wuchsen in der Primärkultur mehr als ein Zellklon und nur einer von diesen sezernierte spezifische Antikörper, so wurde durch das Reklonieren verhindert, daß diese Zellen von den anderen überwachsen wurden. Außerdem erhielt man durch Reklonierung eine Zellinie, die nur von einer Zelle ausgegangen war, und damit auch kein Gemisch von verschiedenen Antikörpern.
Nach 3-4 Wochen und mehrfachem Mediumwechsel wurden die Überstände der gewachsenen Hybridzellen auf Aktivität untersucht.

2.2.6. Aszites

Die Konzentration an monoklonalen Antikörpern, die Hybridzellen ins Medium abgaben, betrug bei 10^6 Zellen und 3-4 Tagen Wachstum ohne Mediumwechsel 10-20 µg/ml (61, 62).
Um eine höhere Ausbeute und damit größere Aktivität im serologischen Test zu bekommen, wurden die Hybridzellen intraperitoneal in mit Pristan vorbehandelte und mit 360 R bestrahlte Mäuse injiziert. Pristan ist ein Mineralöl und verursachte nach Injektion peritoneale Granulome (66).
Die Vorinjektion mit dem Öl sollte mindestens 3 Tage vor der Injektion der Hybridzellen geschehen und nicht älter als einen Monat sein (66). Nach 2-3 Wochen konnte man die Aszitesflüßigkeit mit einer Spritze entnehmen.

2.2.7. Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden abzentrifugiert und jeweils 2 x 10^6 in 1

ml DMEM oder RPMI 1640 Medium mit 15% FCS resuspendiert. Die Suspension wurde in Probenröhrchen überführt, 2-3 Tropfen DMSO dazugegeben (Pasteurpipette), in Schaumstoff eingewickelt und bei -70°C eingefroren. Die längere Aufbewahrung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -190°C.

2.2.8. Auftauen von eingefrorenen Zellen

Die Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und zweimal mit Medium ohne FCS gewaschen, um das DMSO zu entfernen. Da die Zahl der lebenden Zellen durch das Einfrieren und Auftauen sehr reduziert worden ist, sollte man die Zellen zu Anfang in wenig Medium wachsen lassen.

2.2.9. Zytotoxischer Test (CT-Test)

Der Überstand der Hybridzellen wurde auf Antikörperaktivität im Zytotoxischen Test untersucht (67).
Die Lymphknotenzellen, die als Testzellen verwendet wurden, wurden folgendermaßen präpariert: Die Maus wurde getötet und alle Lymphknoten entnommen. Auf einem Sieb (Collector, Tissue Sieve, Bellco Glass, Inc.) wurden die Lymphknoten zerdrückt und die einzelnen Zellen in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS aufgenommen. Die Zellen wurden einmal gewaschen, in 1 ml Medium resuspendiert und jeweils 0,5 ml auf 0,3 ml Ficoll überschichtet. Durch Zentrifugation (5 min., 2000 g, Fischer-Zentrifuge) werden Erythrozyten und tote Lymphozyten von den lebenden, die sich in der Zwischenphase ansammeln, getrennt. Dreimaliges Waschen der Zellen mit RPMI 1640 Medium entfernte alles restliche Ficoll. Die Zentrifugation dauerte jeweils 30 sec bei 1500 g. Anschließend wurden die Zellen auf 2 x

10^6/ml eingestellt. Für den Zytotoxischen Test wurde in jede Vertiefung auf den Terasaki-Platten 2 µl des zu untersuchenden Serums und 2 µl der eingestellten Testzellen gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 20 min. bei RT, und danach gab man mit einer Pasteurpipette einen Tropfen Medium dazu.
Nach weiteren 10 min. wurde der Tropfen von der Platte dekantiert. Durch diesen Waschschritt entfernte man alle nicht gebundenen Aktivitäten des Serums. Zu den Zellen wurde dann das Komplement gegeben und erneut für 45 min. bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen mit Formaldehyd (5% in PBS) fixiert, eine Glasplatte aufgelegt und das Ergebnis des Testes im Phasenkontrastmikroskop abgelesen (% tote Zellen).

2.2.10. Absorption

Zur Entfernung von Antikörpern mit unerwünschter Aktivität aus einem Antiserum wurde das Serum mit Zellen, die Antigene dieser Spezifität auf ihren Membranen tragen, inkubiert, die Antikörper wurden gebunden und konnten mit den Zellen abzentrifugiert werden.
Für die Absorptionen wurden Milzzellsuspensionen hergestellt (Präp. siehe unter CT-Test), diese 8 min. bei 1800 rpm zentrifugiert und zu den Zellen 2 ml einer 0,85%-igen NH_4-Cl-Lösung (in H_2O) gegeben. Durch anschließende Inkubation von 2 min. bei 37°C wurden die Roten Blutzellen lysiert und dann durch Zentrifugation entfernt.
Dann wurden die Zellen gezählt und die Anzahl, die zur Absorption benutzt werden sollte, in ein Beckman-Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Zellen wurden 1 min. zentrifugiert

(Beckman Mikrofuge), der Überstand verworfen und zu den gepackten Zellen das zu absorbierende Serum in der gewünschten Verdünnung gegeben.
Antiserum und Zellen wurden gemischt und unter mehrmaligem Mischen im Eisbad inkubiert. Nach 60 min wurde 2 min zentrifugiert (Beckman Mikrofuge), der Überstand, also das absorbierte Serum, in ein neues Röhrchen übertragen und nochmals zentrifugiert, um alle Zellen zu entfernen. Das absorbierte Serum wurde gegen Zellen des Stammes, mit denen es absorbiert wurde, getestet. Als Kontrolle wurde nicht absorbiertes Serum in gleichen Verdünnungen getestet.

2.2.11. Quantitative Absorption

Die quantitative Absorption wurde dann durchgeführt, wenn es sich um Antikörper mit Aktivität gegen das gleiche Antigen handelt, und quantitative Unterschiede an verschiedenen Zellen/Geweben erfaßt werden sollten.
Die Zellpräparation erfolgte wie bei der oben beschriebenen Absorption. Die Zellen wurden gezählt und dann eine Verdünnungsreihe angefertigt. Dazu gab man unterschiedliche Zellzahlen in Beckman-Röhrchen, von 2×10^5 bis zu 10^7 Zellen, zentrifugierte (wie oben), gab dann gleiche Mengen von der gleichen Verdünnung eines Antiserums zu den gepackten Zellen und inkubierte, wie oben beschrieben.
Die mit unterschiedlichen Zellzahlen absorbierten Antiseren wurden ohne Verdünnungsreihe gegen die einzelnen Zellen getestet. Als Kontrolle testete man nicht absorbiertes Serum.

2.2.12. Immundiffusion

Die Ouchterlony-Immundiffusion zur Bestimmung von Anti-

körperklassen und zur Untersuchung von Ss Protein wurde in einem 1,5% Agargel, das 0,72% NaCl, 0,6% Natriumcitrat, 0,05% Natriumazid und 2,5% PEG 1000 enthielt, durchgeführt (20).
Der Agar wurde mit allen Bestandteilen so lange gekocht, bis die Lösung klar war und dann mit einer Pipette auf Objektträger verteilt. Für einen Objektträger waren 3,5 ml Agar ausreichend.
Sobald der Agar fest war, konnten die Löcher für das Auftragen der Lösungen gestanzt werden.
Die Diffusion erfolgte bei RT.

2.2.13. Hämagglutinationstest

Der Polyvinylpyrrolidon-(PVP) Test wurde nach Stimpfling (1971) mit folgenden Modifizierungen durchgeführt (63).
Das 45% PVP wurde mit PBS-Puffer, pH 7,0, zu einer 10% Stammlösung verdünnt und dann im Kühlschrank aufbewahrt. Diese Stammlösung sollte man nicht länger als 3-4 Wochen benutzen.
Da es mit dem halbflüssigen 45% PVP sehr schwierig ist, eine exakte 10% Lösung herzustellen, sollte jeder Ansatz mit einem starken und einem schwachen Antiserum getestet werden, um die beste Endverdünnung zu bekommen. Sie schwankt meistens von 0,8 - 1,4%.
Die Stammlösung wurde dann mit 0,1% BSA (in PBS) verdünnt. Die Antiseraverdünnungen wurden in 0,8% PVP-Lösungen durchgeführt.
Die Mauserythrozyten wurden in 0,85% NaCl auf eine Konzentration von 2-3% eingestellt und ein Tropfen dieser Suspension zu 2 Tropfen BSA-PBS-PVP in 7 x 10 mm Teströhrchen gegeben.

Bei RT wurde 1,5 - 2 Stunden inkubiert, danach 1,5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Test wurde abgelesen, indem man das Sediment mit 0,85% NaCl vorsichtig aufwirbelte und den Grad der Agglutination bestimmte. Bei starker Agglutination, also bei einem starken Antiserum, bildeten die Erythrozyten Klumpen, bei einem schwachen Serum lösten sie sich sofort voneinander.

2.2.14. Inhibition der PVP-Hämagglutinationsaktivität

50 µl Antiserum wurden in einer 1,2% PVP-Lösung in entsprechender Verdünnungsreihe auf die Teströhrchen verteilt. Nach Zugabe von 50 µl frischem Serum oder Plasma oder 50 µg C4b oder C4 Bp in die einzelnen Röhrchen erfolgte eine Inkubation von 30 min bei RT.
Anschließend wurde die 2%-ige Erythrozytenlösung in die Teströhrchen gegeben und der PVP Test entsprechend beendet. Alle Inhibitionstests wurden so durchgeführt, daß sowohl das Antiserum als auch die inhibierende Substanz verdünnt wurden, so daß jede Antikörper-verdünnung gegen jede der Inhibitorverdünnungen getestet wurde. Die Konzentrationen der Substanzen wurden so gewählt, daß die gleichen Bedingungen wie im direkten Hämagglutinationstest vorlagen.
Um zu verhindern, daß das Plasma aktiviert wird, wurde in einigen Fällen anstelle von PBS für die PVP-Lösung 0,02 M EDTA in 0,2 M Tris-HCl (pH 8,0) verwendet.

2.2.15. Entfernen von Antigenen von der Zelloberfläche (69)

10^7 T-Lymphozyten oder 100 µl Erythrozyten in 0,15 M NaCl (1 Volume/1 Volume) wurden in einer 10% Sucroselösung (Endkonzentration) mit oder ohne normalem Mäuseserum über Nacht bei

4°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit 0,85% Saline gewaschen, gezählt und im PVP-Hämagglutinationstest oder Radioimmunoassay getestet.
Antigene, die nur passiv an Zellmembranen gebunden sind, lösen sich in Lösungen mit geringer Ionenstärke von den Zellen.

2.2.16. Readsorption

100 µl Erythrozyten in 0,15 M NaCl (1 Volume/1 Volume) wurden mit 100 µl syngenetischem oder allogenetischem normalem Mäuseserum in 0,8 ml Sucroselösung (Endkonzentration von 10% w/v) über Nacht bei 4°C inkubiert.
Die Reaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit 0,85% Saline gestoppt, und die Zellen im PVP-Hämagglutinationstest untersucht.

2.2.17. Normales Mäuseserum und Plasma

Mäuse im Alter von 3 bis 6 Monaten wurden vom retro orbitalen Sinus geblutet und das Blut zum Koagulieren für 2-4 h bei 4°C aufbewahrt. Das Serum wurde abzentrifugiert, gepoolt und bei -70°C gelagert.
Normales Plasma wurde auf folgende Weise gewonnen: Das Blut wurde in 0,02 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,15 M NaCl, 0,1% NaN_3 und 0,02 M Na_2-EDTA aufgenommen und die Erythrozyten durch zentrifugation entfernt. Das Plasma wurde in Aliquots abgefüllt und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.18. Reinigung von Serum und Plasma

Um Ss oder C4b Moleküle aus Serum oder Plasma zu entfernen,

wurden 100 µl des Serums mit 100 µl der entsprechenden anti Ss und anti C4b Antiseren über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend 5 min bei 10 000 g zentrifugiert. Das gereinigte Serum oder Plasma wurde im Ouchterlony Immundiffusionstest untersucht und notfalls noch einmal absorbiert.

2.2.19. Affinitäts-Chromatographie

Die Affinitäts-Chromatographie mit CN-Br aktivierter Sepharose-4b wurde nach Axén et al. (70) durchgeführt.
1 g Sepharose Gel wurde mit 0,001 M HCl 15 min gewaschen. 10-20 mg der Substanz, die an Sepharose gekoppelt werden sollte, z.B. durch Ammonsulfatfällung gereinigte Antikörper von Maus oder Kaninchen, wurden in 5 ml Bindungspuffer (0,1 M $NaHCO_3$, 0,5 M NaCl) gelöst, mit dem gequollenen Sepharose-Gel gemischt und für 2 h auf einem Schüttler inkubiert.
Nicht gebundenes Material wurde mit Bindungspuffer ausgewaschen und alle gebundenen aktiven Gruppen wurden durch Inkubation für 1-2 h in Tris-HCl Puffer (0,1 M Tris, 0,2 M NaCl, 0,06 M HCl) bei pH 8,0 blockiert.
Um nicht kovalent absorbierte Proteine zu entfernen, wurde das Gel dreimal mit Azetat-Puffer (0,2 M HCl, 0,2 M Natriumzetat, 0,5 M NaCl, pH 4,0) gewaschen, gefolgt von einem Waschschritt mit Borat Puffer (0,1 M H_3BO_3, 0,5 M NaCl, pH 9,0)

2.2.20. Spezifische Reinigung mit Kaninchen-anti-Maus-Serum

Serum von Kaninchen, die mit Maus Ig, IgG und Igm immu-

nisiert worden waren, wurde durch eine Ammonsulfatfällung vorgereinigt und anschließend über eine Sepharose-IgG- oder -IgM-Säule spezifisch gereinigt. Die Ig-Sepharose wurde dazu fünfmal mit Glycin-HCl Puffer (0,2 M Glycin, 0,2 M HCl, pH 2,2) auf einem Büchner-Trichter gewaschen und anschließend zehnmal mit 0,02 M Tris-HCl, pH 7,4.
Danach wurden das Kaninchenserum und die Ig-Sepharose in einem Becherglas für 30 min bei 4°C inkubiert. Nicht gebundenes Material wurde durch Waschen mit 0,02 M Tris-HCl entfernt.
Die gebundenen Kaninchen Antikörper wurden mit Glycin-HCl-Puffer von der Sepharose gelöst und der pH-Wert sofort auf pH 7,0 eingestellt.

2.2.21. Jodierung

Die gereinigten Kaninchen Immunglobuline wurden für den Radioimmunoassay auf folgende Art jodiert: 0,5 ml $Na^{125}J$, 100 µg Protein (1 mg/ml PBS) und 10 µl Chloramin (4 mg/ml PBS) wurden 2 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 µl Natriummetabisulfat (10 µg/ml PBS) gestoppt und durch 100 µl freies Natriumjodid (10 mg/ml PBS) gesättigt. Anschließende Dialyse gegen PBS über zwei Tage mit mehrfachem Pufferwechsel entferte alles nichtgebundene Jod und Proteinbruchstücke mit geringem Molekulargewicht. Nach der Dialyse kamen 10 mg BSA als Trägerprotein zu den markierten Antikörpern. Aliquots wurden abgefüllt und bei -20°C aufbewahrt. Die Effizienz der Jodierung lag bei 40-70% Bindung der eingesetzten cpm.

2.2.22. Radioimmunoassay

Der Bindungstest wurde mit geringen Modifikationen nach Morris und Williams (71) durchgeführt.
50 µl des Antiserum wurden in geeigneter Verdünnung mit 50 µl Zellen (10^7 Zellen/ml PBS, 5% FCS und 0,01% Natriumazid) für 30 min in Mikrotiterplatten auf Eis inkubiert. Dreifaches Waschen mit PBS-Puffer bei 1500 rpm für 5 min entfernte alle nichtgebundenen Antikörper. Zu den gewaschenen Zellen wurden 50 µl jodierte Kaninchen anti Maus Antikörper (2×10^7 cpm/ml) gegeben und nochmals für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde wieder, wie schon oben erwähnt, fünfmal gewaschen und die Löcher auf den Mikrotiterplatten mit 50 µl PBS Puffer aufgefüllt. Mit Hilfe des Titertek Cell-Harvesters (Flow Lab., UK) wurden die Zellen auf Filterpapiere gesaugt und anschließend im γ-Counter gezählt. Alle Tests wurden in Triplikaten durchgeführt.

2.2.23. Inhibition der Antikörper im Radioimmunoassay

Vor der Zugabe der Zellen wurden 50 µl des Antiserums mit 50 µl der Substanz (Plasma, Serum), die auf ihre Inhibitionsfähigkeit untersucht werden sollte, für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Bindungstest wie oben beschrieben durchgeführt. Um eine Verdünnung des Antiserums durch die inhibierende Lösung zu verhindern, wurde der Antikörper entsprechend konzentriert eingesetzt.

2.2.24. Reinigung von T-Zellen über Nylonwolle

Die Methode wurde entsprechend der Vorschrift von Julius et al. (72) durchgeführt. Eine 10 ml Spritze wurde mit 8 ml

PBS mit 5% FCS und 0,1% Natriumazid gefüllt. 0,5 g Nylonwolle (Leuko-Pak Leukocyte Filter, Fenwal Lab., USA) wurden bis zur Höhe von 5 ml in die Spritze gestopft.
Nach dem Waschen mit 20 ml PBS mit 5% FCS und 0,1% Natriumazid wurde die Spritze unten verschlossen, 2 ml angewärmter ($37^{o}C$) Puffer auf die Nylonwolle aufgelagert und 1 h bei $37^{o}C$ inkubiert.
In einem Volumen von 2 ml wurden 1×10^{8} Zellen auf die Nylonwolle aufgetragen und mit 2 ml PBS ($37^{o}C$) langsam eingewaschen. Die Spritze blieb während der gesamten Reinigung in vertikaler Position. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt bei $37^{o}C$ für 1 h. Die Spritze wurde dann langsam mit PBS Puffer ($37^{o}C$) ausgewaschen und die ersten 25 ml in einem konischen Röhrchen gesammelt und bei $4^{o}C$ mit 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Wurde die Reinigung mit Milzzellen durchgeführt, so erhielt man nach einer Absorption der Zellen über Nylonwolle eine Zellpopulation mit 85-90% T-Zellen, weniger als 5% B-Zellen und ungefähr 10% nicht identifizierbarer Zellen. Bei Verwendung von Lymphknotenzellen war die Reinigung entsprechend besser, da der Anteil an T-Zellen größer ist. In diesem Fall waren zwischen 80 und 90% der Zellen T-Zellen und weniger als 1% B-Zellen.

2.2.25. Reinigung von B-Zellen

Um eine hochgereinigte B-Zell-Population zu erhalten, werden 5×10^{7} Milzzellen mit 0,5 ml eines hochtitrigen anti-Thy 1 Maus-Serums für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml 1:4 verdünntem nicht toxischem Kaninchen Komplement werden die Zellen für 45 min bei $37^{o}C$ inkubiert und anschließend

über Ficoll gereinigt. Nach dieser Behandlung sind mehr als 95% der Zellen Ig^+ und unter 1% Thy-1 positiv.

2.2.26. Stimulierung von T-Zellen mit Concanavalin A (Con A)

Die Stimulierung von T-Zellen mit Con A wurde mit geringen Änderungen nach Götze (73) durchgeführt. 4 x 10^6 Lymphozyten/ml wurden für 3 Tage mit 50 µl/ml Con A in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert, danach zentrifugiert und anschließend über Nylonwolle gereinigt. Das Medium wurde konzentriert und zu Inhibierungsexperimenten verwendet.

2.2.27. Stimulation von B-Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS)

LPS Lymphoblasten wurden erhalten, indem 4 x 10^6 Lymphozyten/ml mit 50 µg/ml LPS in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert wurden. Nach 3 Tagen wurden die Zellen mit RPMI ohne FCS gewaschen und entsprechend weiterverwendet.

2.2.28. Gemischte Lymphozyten Reaktion (MLR)

Die Herstellung von MLR-Lymphoblasten erfolgte nach der Methode von Geib und Klein (74). Die gemischte Lymphozyten Reaktion wurde in eine Richtung durchgeführt, wobei T-Zellen als Responder und bestrahlte Milzzellen als Stimulator dienten. Die T-Zellen wurden zuvor über Nylonwolle gereinigt. Eine Mischung aus 10^7 Responder- und 2 x 10^7 Stimulator-Zellen wurde in 4 ml RPMI mit 10% FCS suspendiert, bei 37°C und 7% CO_2 48-60 h inkubiert und der Stimulationsindex bestimmt.

2.2.29. Bestimmung des Stimulationsindex (SI)

Zur Messung von Stimulationsindices von Con A, LPS oder MLR

Stimulierungen wurden jeweils dreimal 200 µl Proben den Gewebekulturflaschen entnommen und in Mikrotiterplatten übertragen. Dazu kamen 50 µl PBS-Puffer, die 1 µCi ^{3}H-Thymidin enthielten. Die Zellen wurden 5-12 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und anschließend mit dem Titertek Cell Harvester auf Filterpapier übertragen. Die Filterscheiben wurden getrocknet und in Scintillationsflüssigkeit für flüssige Scintillations Spectronomy die cpm gezählt. Der Stimulationsindex (SI) wurde mit folgender Formel bestimmt.

$$SI = \frac{\text{cpm allogenetik}}{\text{cpm syngenetik}} \quad \text{für MLR}$$

und

$$SI = \frac{\text{cpm Zellen mit Con A, LPS}}{\text{cpm Zellen ohne Con A, LPS}}$$

2.2.30. Makrophagenkultur

5 ml steriles RPMI 1640 ohne FCS wurden einer Maus in das Peritoneum injiziert und anschließend wieder steril entnommen. Die Zellen wurden aus dem Medium durch Zentrifugation pelletiert und in Gewebekulturflaschen mit 5 ml RPMI 1640 Medium und 10% FCS überführt.
Nach 10-20 h hafteten die Makrophagen am Boden der Flasche, während alle übrigen Zellen sich in Suspension befanden und mit einer Pipette entfernt werden konnten. Die Flasche wurde zweimal gespült, mit Medium gefüllt und die Makrophagen wieder inkubiert. Nach zwei Tagen konnte das Medium entnommen, konzentriert und für Inhibierungsexperimente verwendet werden.

Für den Bindungstest an Makrophagen wurden die adherenten Zellen mit 1-2 ml 0,25% Trypsin (in Hanks BSS, Ca- und Mg-frei) für 2 min bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Makrophagen, die sich dabei vom Plastikboden lösten, wurden mit einer Pipette aus der Flasche entnommen und zweimal durch Zentrifugation gewaschen.
Der Bindungstest wurde wie unter Radioimmunoassay beschrieben durchgeführt.

2.2.31. In Vitro Markierung

10^6 Zellen wurden 1-2 h in 0,2 ml leucinfreies RPMI-Medium mit 15% FCS und mit 100 µCi ^{3}H-Leucin bei 37°C und 10% CO_2 im Brutschrank inkubiert (75).
Danach gab man 1 ml RPMI 1640 mit 15% FCS ohne Leucin zu den Zellen und inkubierte für weitere 4 h. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (8 min bei 1800 rpm), der Überstand wurde abgenommen und zum Entfernen aller Zellen oder Zellreste noch einmal zentrifugiert (8 min bei 1800 rpm). Der Überstand und die Zellen wurden auf Radioaktivität untersucht.

2.2.32. Indirekte Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation von radioaktiv markierten NP-40 solubilisierten, über Lentil-Lectin-Säulen gereinigten Milzzelllysaten wurde wie folgt durchgeführt (76):
25-50 µl Antiserum wurden für 4 h bei 4°C mit einem Aliquot des Lysats (2 x 10^5 cpm) inkubiert. Der lösliche Antikörper-Antigen-Komplex wurde mit Hitze-fixierten Staphylococcus aureus präzipitiert. Dazu wurde ein Überschuß (4-10 Volumen des Antiserums) von 10% Staph A in SRB (0,01 M Tris-HCl

(pH 7,4), 0,85 M NaCl, 0,25% NP-40) zu dem Lysat gegeben, 30 min bei 4°C inkubiert und zentrifugiert (10 000 g, 5 min). Das Präzipitat wurde dreimal mit SRB gewaschen und das markierte Antigen in 4% SDS (in Sammel-Gel Puffer, 0,02% Bromphenol-Blau, pH 0,8) durch 30 minütige Inkubation bei RT von Staph A gelöst. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (10 000 g, 5 min) und der Überstand mit dem radioaktiv markierten Antigen bei -20°C aufbewahrt oder sofort für die Elektrophorese benutzt.

2.2.33. Antigen Präparation

Die löslichen Antigene für die Präzipitationen wurden folgendermaßen hergestellt (77):
Die Milzzellsuspension wurde in sterilem Hanks BSS ohne Serum aufgenommen und zweimal gewaschen.
Das Medium zur Markierung wurde durch Mischung der einzelnen Aminosäuren ohne Tyrosin und Leucin mit Hanks BSS und 7,5% $NaHCO_3$ hergestellt.
Nach dem Waschen wurden 5 x 10^7 lebende Zellen in diesem Medium aufgenommen. 1 mCi ^{3}H-Leucin und 1 mCi ^{3}H-Tyrosin wurden in einer Konzentration von 250 µCi/ml zu 3-4 x 10^8 Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für 6-8 h bei 37°C in 10% CO_2.
Danach wurden die Zellen zweimal mit Hanks BSS gewaschen und in 0.5% NP-40 in Tris-NaCl (0,01 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,4) in einer Konzentration von 10^8 Zellen/ml suspendiert. Es folgte eine Inkubation von 45 min auf Eis. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation entfernt (Beckman microfuge). Das Lysat wurde entweder sofort für Experimente benutzt oder bei -70°C eingefroren.

2.2.34. Lectin Affinity Chromatographie

Lectin, kovalent an Sepharose C4B gekoppelt, wurde nach dem Quellen in Bio-Rad Econo Säulen gefüllt und vor jedem Gebrauch mit SRB gewaschen. Um unspezifische Bindung von Proteinen an die Säule zu verhindern, wurden die nicht saturierten Bindungsstellen mit 1 ml 0,5% BSA in SRB abgesättigt. Das NP-40 Lysat wurde, um unlösliches Material zu enfernen, nochmals zentrifugiert und dann auf die Säule gefüllt. Nachdem die Säule mit 100 ml SRB gewaschen worden war, wurde das gebundene Material mit 30-35 ml 0,5 M Methyl-Mannosid (20 ml/h) in SRB, pH 7,4, von der Säule entfernt. Zu dem Glykoproteinpool kam als Trägerprotein BSA in einer Konzentration von 1 mg/ml. Der Pool wurde in Amicon Konzentratoren mit PM10 Filtern (Ausschluß MW 10 000 Dalton) auf ein zehntel des Volumens eingeengt.
Um markierte Immunglobuline zu entfernen, wurde die Antigenpräparation mit NMS und Ramig bei 4°C für 4 h inkubiert.
Die unlöslichen Komplexe wurde mit 10% Staph A in SRB entfernt (78).

2.2.35. Herstellung von Protein A aus Staphylococcus aureus-Kulturen

Die Cowan I Kulturen (Protein A Produzent) von Staphylococcus aureus waren ein Geschenk von Dr. W. Bessler (Univ. Tübingen). Die Kulturbedingungen wurden nach Kessler (79) modifiziert. Die Bakterien wurden in Röhrchen auf Agar mit Tryptic-Soy Broth angeimpft, am zweiten Tag in Erlenmeyerflaschen mit 250 ml Tryptic Soy Broth überführt und für 24 h auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Am dritten Tag wurden 5 ml in

in einen Mikrofermenter mit 200 l Medium übertragen und unter Belüftung bei 37°C für weitere 24 h gezüchtet.

2.2.36. Fixierung

Das Fixieren der Bakterien und Töten durch Hitze wurde wie folgt durchgeführt (80): Die Bakterien wurden zweimal durch Zentrifugation (10 000 rpm, 20, Sorvall Zentrifuge) mit PBS gewaschen, in PBS (mit 0,05% NaN_3, 0,5% Formalin) resuspendiert (10% w/v) und 11,5 h bei 23°C gerührt. Anschließend wurden die Bakterien 15 min bei 10 000 rpm abzentrifugiert, einmal mit PBS-Azid ohne Formalin gewaschen, wieder in Puffer ohne Formalin aufgenommen, und durch 5 min Inkubation in einem 80°C Wasserbad unter starkem Schütteln getötet. Danach wurden die Kulturen sofort auf Eis abgekühlt, zweimal mit PBS-Azid gewaschen, in PBS-Azid aufgenommen (10% w/v), in Aliquots abgefüllt und bei -20°C aufbewahrt. Vor jedem Gebrauch wurden die Bakterien einmal mit SRB gewaschen und auf eine Endkonzentration von 10% in SRB eingestellt.

2.2.37. Ammoniumsulfatfällung

Zur Isolierung von Antikörpern aus Serum, Aszites oder Gewebekulturen wurde eine 50% Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Die gesättigte Ammoniumsulfatlösung (750 g/l) wurde langsam in der Kälte in die zu präzipitierende Substanz getropft, das Präzipitat 20 min bei 10 000 rpm zentrifugiert, dreimal gewaschen und 2-3 Tage gegen 0,02 M Natriumphosphat-Puffer (pH 8,2) dialysiert.

2.2.38. SDS-Polyacrylamid Elektrophorese

2.2.38.1. Puffer und Lösungen

30% Acrylamidlösung:

30 g Acrylamid und 0,8 g Bisacrylamid wurden in 100 ml H_2O gelöst.

Trenngelpuffer:

45,4 g Tris wurden in 300 ml H_2O gelöst, mit konzentrierter HCl-Lösung auf pH 8,8 eingestellt, auf 500 ml aufgefüllt und bei 4°C aufbewahrt.

Sammelgelpuffer:

15,1 g Tris wurden in 300 ml H_2O gelöst, mit konzentrierter HCl-Lösung auf 500 ml aufgefüllt und bei 4°C aufbewahrt.

Ammoniumpersulfat-Lösung

Ammoniumpersulfat-Lösung (10 mg/ml) wurde täglich frisch angesetzt.

M-N,N,N'-tetramethyl-ethylene-diamine (TEMED)

TMED wurde unverdünnt eingesetzt.

SDS-Lösung

0,5% SDS Lösung wurde mit H_2O angesetzt.

Elektrophoresepuffer:

144 g Glycin, 30,25 g Tris und 10 g SDS wurden in 2 l H_2O gelöst, die Lösung wurde auf pH 8-9 eingestellt und bei RT aufbewahrt.

2.2.38.2 Trenngel

Für 40 ml 10% Trenngel-lösung wurden folgende Materialien

verwendet. 10 ml Trenngelpuffer (pH 8,8), 13,3 ml 30% Acrylamidlösung, 15,9 ml H_2O, 0,8 ml 5% SDS.
Nach dem Mischen wurde die Lösung entgast, 0,2 ml Ammoniumpersulfat (10%) und 20 µl TEMED dazu gegeben und nochmals vorsichtig gemischt.

2.2.38.3. Sammelgel

Für das 5% Sammelgel wurden folgende Materialien benötigt: 5 ml Sammelgelpuffer (pH 6,8), 2 ml 30% Polyacrylamid (30%), 12,6 ml H_2O, 0,4 ml 5% SDS. Die Lösung wurde entgast, 75 µl 10% Ammoniumpersulfatlösung und 7,5 µl TEMED dazugegeben und vorsichtig gemischt.

2.2.38.4. Flachgelelektrophorese (81)

Für SDS Flachgele wurden Elektrophoresekammern von Bio-Rad, Modell 220, benutzt. Die Gelkonzentrationen waren für das Sammelgel 5% und für das Trenngel 10% Acrylamid.
Das Trenngel hatte eine Länge von 10 cm und war 1,5 mm dick. Nach dem Auftragen der Proben auf das Sammelgel lief die Elektrophorese von Kathode zu Anode bei 50 V für 1-2,8 h. Nach dem Eintreten der Proben in das Trenngel wurde für 4-5 h auf 110 V umgeschaltet. Nach dem Lauf wurde das Gel in 50% Trichloressigsäure fixiert und mit 1% Coomassie-blue R250 gefärbt. Unspezifische Färbung wurde mit 7% Essigsäure und mehrfachem Wechsel der Säure über Nacht entfernt. Fotographien vom Gel wurden mit Polaroid Filmen Typ 55 durchgeführt.

2.2.38.5. Elektrophorese in Röhrchen-Gelen

4,5 ml Trenngelmischung wurde in Glasröhrchen (200 mm lang,

Durchmesser 6 mm) gefüllt und mit Wasser überlagert. Nach 30 min waren die Gele polymerisiert, das Wasser wurde abgesaugt und Sammelgelpuffer für ein 2 cm langes Gel in das Röhrchen gefüllt und bis zur Polymerisation stehengelassen. Nach dem Entfernen des Wassers wurden die Proben aufgetragen und für 6-8 h bei 120-150 V von Kathode zu Anode elektrophoretisiert. Die Proben wurden kurz vor dem Auftragen für 2 min mit 2% Mercaptoäthanol gekocht, um die Proteine zu reduzieren, und mit 8000 x g abzentrifugiert.
Nach dem Lauf wurden die Gele fraktioniert (2 mm Scheiben) und mit einem automatischen Gelfraktionator (Gilson) mit 0,5% SDS in 1 M NHc, HCO_3 (pH 8,5) im Puffer Reservoir in Röhrchen gefüllt. Zu jedem Röhrchen kamen 3 ml Beckman Ready-solv scintillation liquid. Die Proben wurden in Beckman LS 7500 gezählt.

3. Ergebnisse

3.1. H-2K Region

Durch die Immunisierung von (A x B10)F_1 Mäusen mit Zellen von B10.P Linien und anschließender Hybridisierung der Milzzellen des Rezipienten mit P-3 Myelomzellen wurde die Hybridzellinie 47/21-13 etabliert.
Der spezifische Antikörper, ein IgG1, kappa, ist nicht zytotoxisch. Deshalb wurden alle Untersuchungen im PVP-Hämagglutinationtests durchgeführt.

3.1.1. Reaktivität gegen unabhängige Inzucht- und rekombinanten Mäuselinien

Die Immunisierung in dieser Kombination war gegen den gesamten H-2 Komplex gerichtet, im genetischen Hintergrund waren Donor und Rezipient identisch.
Tabelle 3 und 4 zeigen das Ergebnis des PVP-Testes gegen Erythrozyten von unabhängigen Inzucht- und rekombinanten Mäuselinien.
Der Antikörper 47/21-13 agglutinierte Zellen von B10.P, dem Donor, von C3H.NB, ebenfalls $H\text{-}2^p$ und von der Rekombinante B10.F(13R). Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß das erkannte Antigen von Genen der K Region des H-2 Komplexes kontrolliert wird. Da Erythrozyten keine Ia Antigene auf der Zelloberfläche tragen, könnte es sich um die private Determinante des $H\text{-}2K^p$-Allels, H-2.16 handeln (82).

3.1.2. Reaktivität mit Gewebe von B10.W-Linien

Der monoklonale Antikörper 47/21-13 agglutiniert Zellen

Tabelle 3. Reaktivität des monoklonalen Antikörpers 47/21-13 im PVP-Hämagglutinationstest mit Erythrozyten von unabhängigen Inzuchtmäuselinien

Mäuselinie	H-2 Haplotyp	Titer des Antikörpers 47/21-13
B10.D2	d	-
BALB/c	d	-
B10.S	s	-
A.SW	s	-
B10.P	p	:80
C3H.NB	p	:80
B10.Q	q	-
DBA/1	q	-
B10	b	-
B10.SM	v	-
B10.RIII	r	-
B10.PL	u	-
B10.BR	k	-
CBA	k	-
B10.M	f	-
A.CA	f	-

Tabelle 4. Reaktivität des monoklonalen Antikörpers 47/21-13 im zytotoxischen Test mit Lymphozyten von rekombinanten Inzuchtmäuselinien

Mauslinie	H-2 Regionen	Titer des Antikörpers
	K A I E S D	47/21-13
B10.F(13R)	p p p p b b	:80
B10.M(11R)	p f f f f d	-
B10.M(17R)	k k k k d f	-
B10.A	k k k k d d	-
A.TL	s k k k k d	-
B10.LG	d f f f f .	-
A.TFR1	s k k k k f	-
A.TFR2	f f f f s d	-
B10.DA	q q q q q s	-
B10.AKM	k k k k k q	-
B10.A(2R)	k k k k d b	-
B10.A(3R)	k k k k d d	-
B10.WB	j j j j j b	-
B10.AQR	q k k k d d	-
B10.QAR	k k k k q q	-

Tabelle 5. Reaktivität des monoklonalen Antikörpers 47/21-13 im PVP-Hämagglutinationstest mit Erythrozyten von B10.W Mäuselinien

Mauslinie	H-2 Regionen			Titer des Antikörpers
	K	I	D	47/21-13
KPA42	v	v	w1	-
KPB32	v	v	w1	-
KPB68	w2	.	w2	-
SAA48	w3	w3	w3	:80
GAA20	w4	w4	w4	-
KEA5	d	.	w5	:80
SNA70	k	k	w7	-
KEA2	w9	.	w9	-
SNA57	v	v	w10	-
DRB62	v	v	w10	-
WOA105	v	v	w10	-
CAA2	f	p	w11	-
MOT1	k	b	w17	-
STA10	w13	w13	w13	-
STA12	w13	w13	w13	-
LIB55	w13	w13	w13	-
STC77	d	p	w17	:80
STC90	w15	w15	w15	-
BUA1	w16	w16	w15	-
CAS2	w17	.	w3	:80
CHR51	d	p	w18	-
GAA37	s	s	w21	-
CAS1	w23	.	w23	-
KPB128	s	s	b	-

Tabelle 5. Fortsetzung

LIB18	w16	w16	w8	-
BUA19	w16	w16	k	-
BUA16	w16	w16	k	-
KPA44	d	w16	w24	-
STA39	w3	w13	w13	-
CHA2	g	k	w26	-
STA62	w27	b	w27	-

der B10.W-Stämme: B10.CAS2, B10.STC77, B10.KEA5 und B10.SAA48 (Tabelle 5). B10.STC77 und B10.KEA5-Mäuse besitzen die H-$2K^d$- und I^p-Allele; B10.CAS und B10.SAA48 besitzen Wild-Allele in der K-Region, die nicht identisch zu bekannten K-Allelen der Inzuchtstämme sind (im weiteren Verlauf der Arbeit entfällt der Zusatz B10 vor den Namen der B10.W Linien).

3.1.3. Absorptionen

Die identische Reaktivität des Antikörpers 47/21-13 mit Zellen von B10.P, STC77, CAS2, SAA48 und KEA5 wurde durch Absorption bestätigt (Abb. 3): die quantitative Absorption mit einer konstanten Menge Antikörper und steigender Zahl von Zellen resultiert in einer für das Gewebe aller vier Mäuse parallelen Verminderung der Reaktivität. Zellen von BALB/c-Mäusen absorbieren dagegen nicht (negative Kontrolle).

3.1.4. "Schachbrett"-Absorptionen

Tabelle 6 zeigt das Ergebnis einer "Schachbrett" Absorption von 47/21-13. Das Antiserum wurde mit Zellen von allen positiven und drei negativen Stämmen, B10.D2, CHR51, STA39, absorbiert und gegen Erythrozyten von denselben Mäusen getestet. B10.P, STC77, KEA5, CAS2, und SAA48 absorbierten das Serum vollständig, während Zellen von B10.D2, STA39 oder CHR51 nicht absorbieren konnten. Die Mausstämme, deren Zellen mit dem Antikörper 47/21-13 reagieren, B10.P, C3H.NB, STC77 und KEA5, besitzen unterschiedliche Allele in der K-Region und I-Region des H-2 Komplexes

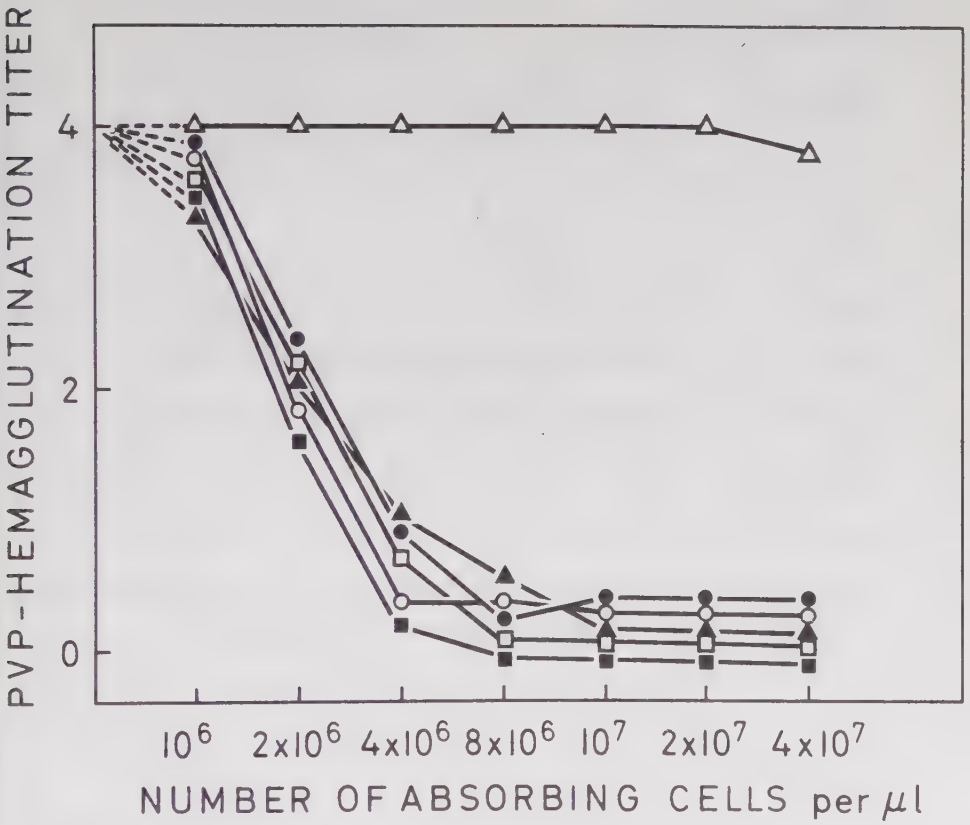


Abbildung 3. PVP-Hämagglutinationstest mit dem monoklonalen Antikörper 47/21-13 mit Erythrozyten von B10.P Mäusen, nachdem der Antikörper mit verschiedenen Zellkonzentrationen von den Mäusen BALB/c (Δ, negative Kontrolle), B10.P (●), STC77 (o), CAS2 (▲), SAA48 (■) und KEA5 (□) absorbiert worden war.

Tabelle 6. "Schachbrett"-Absorptionen mit dem monoklonalen Antikörper 47/21-13

getestet an	Absorbiert von							
	B10.P	B10.D2	STC77	SAA48	KEA5	CAS2	CHR51	ST
B10.P	-	:80[a]	-	-	-	-	:80	:
B10.D2	-	-	-	-	-	-	-	-
STC77	-	:80	-	-	-	-	:80	:
SAA48	-	:80	-	-	-	-	:80	:
KEA5	-	:80	-	-	-	-	:80	
CAS2	-	:80	-	-	-	-	:80	:
CHR51	-	-	-	-	-	-	-	-
STA39	-	-	-	-	-	-	-	-

[a]Titer des Antikörpers im PVP-Hämagglutinationstest.

	K	I	D
B10.P, C3H.NB	p	p	p
KEA5	d	p	w5
STC77, KEA5	d	p	w18
CHR51	d	p	w18
CAS2	w17	.	w3
SAA48	w3	w3	w3
STA39	w3	w13	w13
BALB/c	d	d	d

Das es sich bei dem von dem Antikörper erkannten Antigen nicht um ein I-Region kontrolliertes Molekül handeln kann (diese sind nicht auf Erythrozyten ausgeprägt), muß es sich um ein Klasse I-Molekül handeln. Es ist denkbar, daß es sich bei der Reaktion des Antikörpers mit B10.STC77 und B10.KEA5-Zellen um eine Kreuz-Reaktion handelt; dann wäre das H-$2K^d$-Allele der B10.W-Linien STC77 und KEA5 nicht identisch mit dem H-$2K^d$-Allel von BALB/c. Es ist aber auch möglich, daß die von dem Antikörper 47/21-13 erkannte Determinante sich an einem anderen als dem H-$2K^d$- bzw. H-$2K^p$ Molekül befindet. Um diese beiden Möglichkeiten zu testen, haben wir sequentielle Präzipitationen durchgeführt.

3.1.5. Kopräzipitation

Der beste Beweis, daß zwei Antikörper unterschiedliche Moleküle entdecken, sind biochemische Untersuchungen in Form von sequentieller Kopräzipitationen. Dabei werden die gereinigten Glykoproteine nacheinander mit beiden Antikörpern präzipitiert. Falls es sich um verschiedene Moleküle handelt, findet man nach Reinigung mit Antikörper 1 noch eine Präzipitation mit Antikörper 2. Handelt es sich um ein gemeinsames

Antigen, so präzipitiert der erste Antikörper vollständig. Die mit radioaktiven Aminosäuren markierten Glykoproteine von SAA48 Lymphozyten wurden zuerst mit dem Alloantiserum T76, αK^k, ((DBA/2 x A.TL) x A.AL), inkubiert und die gebundenen Antigene präzipitiert (Abb. 4A). Anschließend erfolgte die Inkubation des Glykoproteinpools mit Aszites des monoklonalen Antikörpers 47/21-13 (Abb. 4E). Als Kontrolle diente NMS. Falls die beiden Antiseren an das gleiche Molekül binden, so sollte der monoklonale Antikörper nach der Inkubation des Pools mit dem Alloantiserum keine Moleküle präzipitieren. Wie in Abb. 4E zu sehen ist, präzipitiert der monoklonale Antikörper nach Vorreinigung mit T76 ein weiteres Klasse I Antigen.

Um auszuschließen, daß es sich um einen quantitativen Effekt handelt, d.h., daß die erste Reinigung nicht vollständig war, wurde der Glykoproteinpool mit dem gleichen Serum, mit dem er vorgereinigt worden war, nochmals inkubiert. Abb. 4D zeigt, daß die Vorreinigung vollständig war. Um auszuschließen, daß die beiden Antikörper unterschiedliche Affinitäten besitzen, wurde das Experiment in umgekehrter Reihenfolge wiederholt. Wie die Aufzeichnungen zu den Abb. 4F und 4G zeigen, war das Ergebnis das gleiche: nach Reinigung mit dem monoklonalen Antikörper präzipitiert das Alloantiserum ein weiteres Klasse I Produkt.

Da das Alloantiserum mit H-$2K^p$ kreuzreagierte, wurden die bidirektionalen Kopräzipitationen mit Glykoproteinen von 13R Lymphozyten wiederholt. Auch in diesen Experimenten konnten beide Antiseren unterschiedliche Klasse I Moleküle isolieren (Abb. 5B und 5G). Da Alloantiseren nicht monospezifisch sind, wurden weitere Untersuchungen mit einem zweiten monoklonalen Antikörper, 119-16/13-34, der mit der privaten Antigendeter-

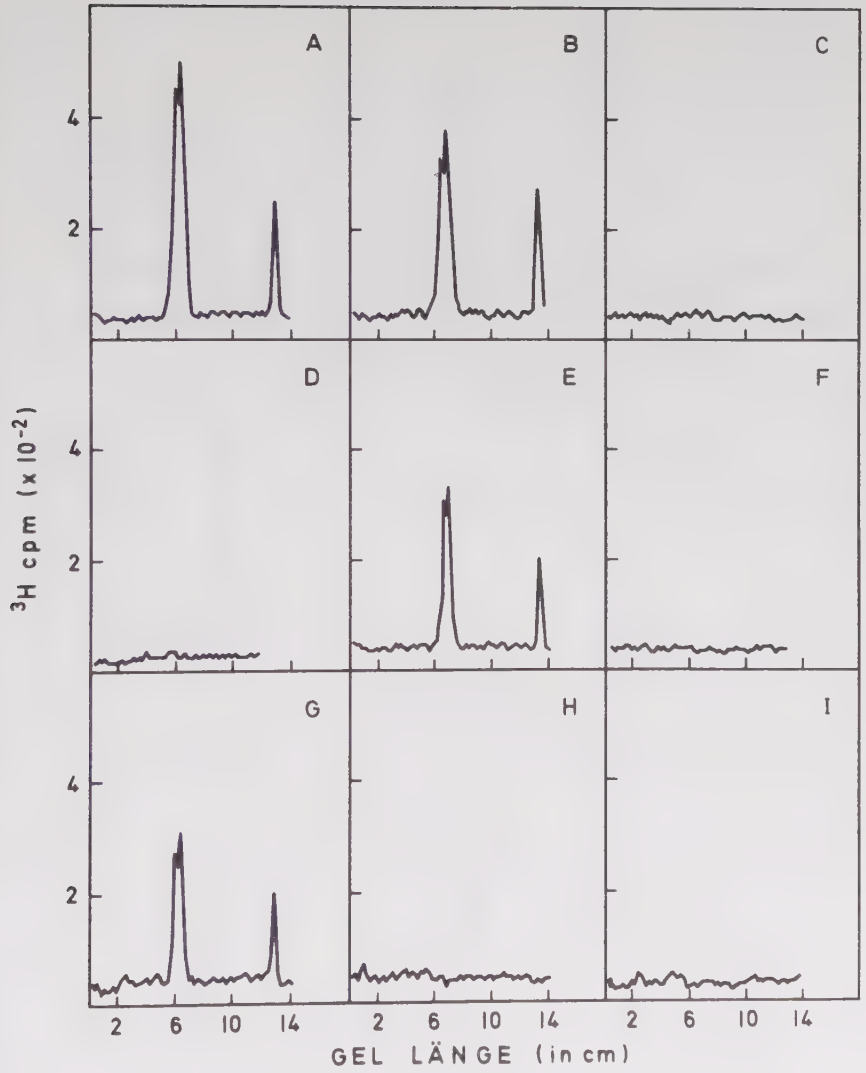

A
B
C
D
E
F
G
H
I
4
2
^{3}H cpm (x 10^{-2})
2
6
10
14
GEL LÄNGE (in cm)

Abbildung 4. Kopräzipitation von SAA48 Glykoproteinen mit dem Alloantiserum T76 und dem monoklonalen Antikörper 47/21-13.

A: Vorreinigung mit NMS, Test mit T76;

B: Test mit 47/21-13; C: Test mit NMS; D: Vorreinigung mit T76, Test mit T76; E: Vorreinigung mit T76, Test mit 47/21-13; F: Vorreinigung mit 47/21-13, Test mit 47/21-13; G: Vorreinigung mit 47/21-13, Test mit T76; H: Test mit NMS als Kontrolle zu D; Test mit NMS als Kontrolle zu F.

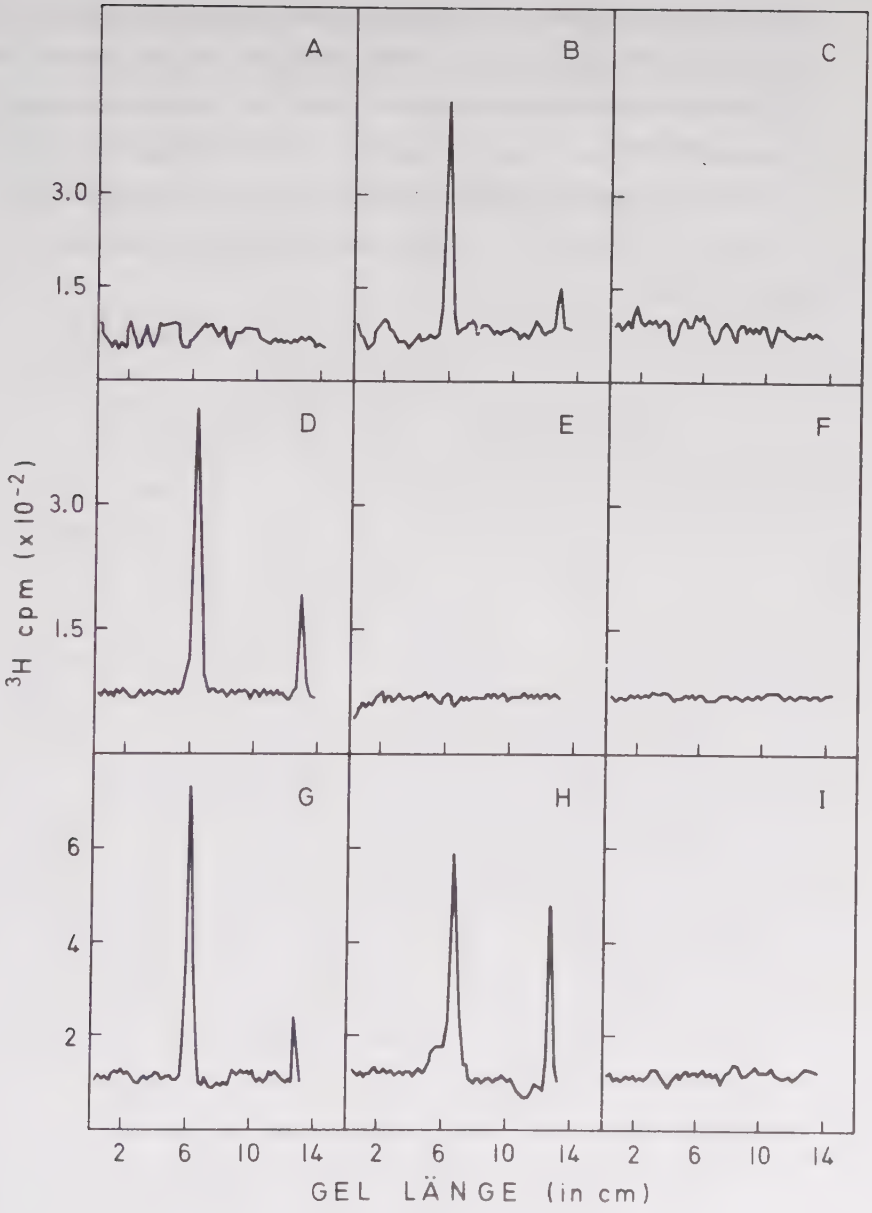

A
B
C
D
E
F
G
H
I
3.0
1.5
3.0
1.5
6
4
2
^{3}H cpm (x 10^{-2})
2
6
10
14
GEL LÄNGE (in cm)

Abbildung 5. Kopräzipitation von B10.F(13R) Glykoproteinen mit dem Alloantiserum T76 und dem monoklonalen Antiköper 47/21-13. A: Vorreinigung mit T76, Test mit T76; B: Vorreinigung mit T76, Test mit 47/21-13. C: Test mit BALB/c Aszites; D: Test mit T76; E: Vorreinigung mit 47/21-13, Test mit 47/21-13; F: Test mit BALB/c Aszites; G: Vorreinigung mit 47/21-13, Test mit T76; H: Test mit 47/21-13; I: Test mit BALB/c Aszites.

minante von H-2K^p, H-2.16 reagiert, ausgeführt (Tabelle 7). Die Präzipitationen mit diesen beiden monospezifischen Antikörpern von 13R Glykoproteinen (Abb. 6) erbrachten die gleichen Ergebnisse wie die, die mit dem Alloantiserum erhalten wurden: Nach Vorreinigung mit 47/21-13 bindet der andere Antikörper (119-16/13.34) noch ein Klasse I Antigen und umgekehrt (Abb. 6B, C und 6E, F).

3.1.6. Diskussion

Der monoklonale Antikörper 47/21-13 bindet innerhalb der Inzuchtlinien an Zellen von B10.P, C3H.NB und B10.F(13R) Mäusen, wodurch die Spezifität in die K Region des H-2^p Haplotypes kartiert wird. Das Molekül, mit dem der Antikörper reagiert, ist ein Klasse I Genprodukt, denn es hat ein Molekulargewicht von 45 000 Dalton und wird außerdem, im Gegensatz zu Produkten der I-Region (Klasse II), auf Erythrozyten exprimiert. Aufgrund dieser Daten würde man schließen, daß der Antikörper gegen die private Determinante des H-2K^p Antigens, H-2.16, gerichtet ist. Die Untersuchungen der B10.W Linien ergaben allerdings, daß der monoklonale Antikörper mit Zellen der Linien KEA5 und STC77 reagiert, die, wie serologische Untersuchen ergaben, nicht ein K^p, sondern ein K^d Allel in der K Region besitzen. In der I Region allerdings sind sie serologisch und auch biochemisch (peptid mapping) identisch mit dem H-2^p Haplotyp.
Die Mauslinien SAA48 (K^{w3}) und CAS2 (K^{w17}) besitzen Wildtyp-K-Allele, die mit keinem Inzucht K-Allel identisch sind, also auch nicht mit H-2K^p; dennoch reagieren auch Zellen dieser Mäuse mit dem monoklonalen Antikörper 47/21-13.

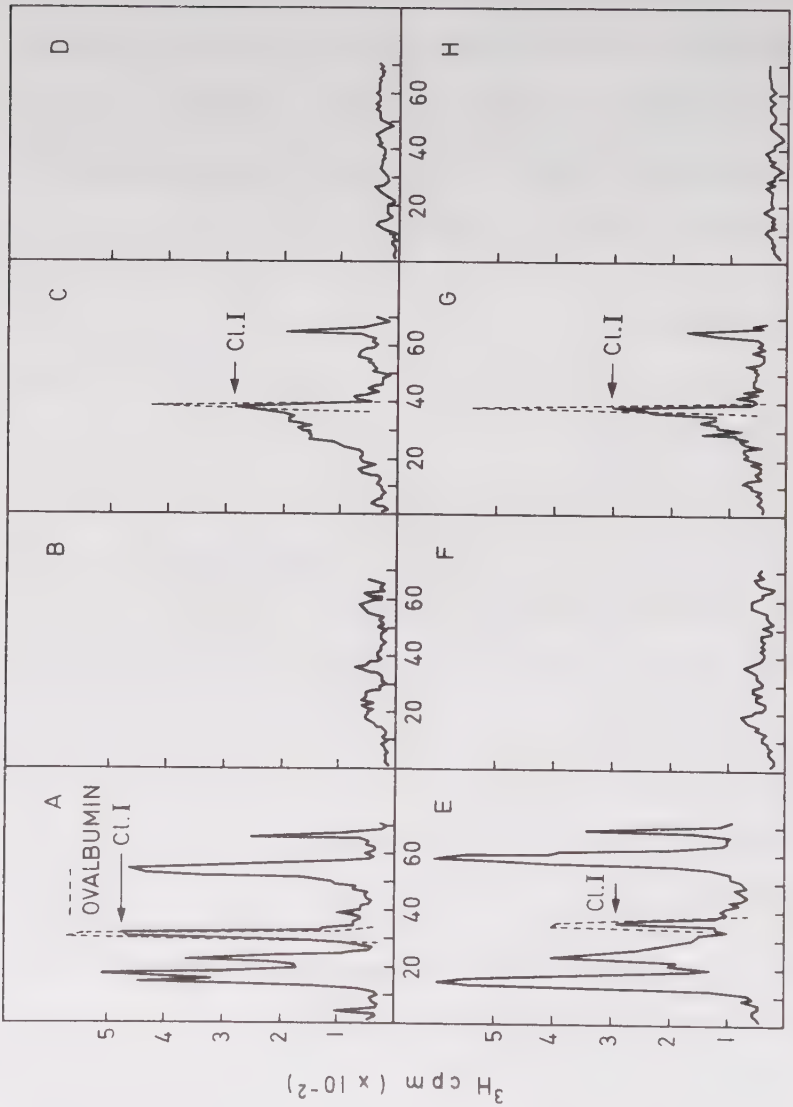

A
B
C
D
E
F
G
H
OVALBUMIN
Cl.I
Cl.I
Cl.I
Cl.I
^3H cpm (x 10^{-2})
GEL FRAKTIONEN

Abbildung 6. Kopräzipitation von B10.F(13R) Glykoproteinen mit den monoklonalen Antikörpern 47/21-13 und 119/16-30.34. A und E: Test mit 119/16-30.34 und 47/21-13; B: Vorreinigung mit 119/16-30.34, Test mit 119/16-30.34; C: Vorreinigung mit 119/16-30.34, Test mit 47/21-13; D: Test mit BALB/c Aszites; F: Vorreinigung mit 47/21-13, Test mit 47/21-13; G: Vorreinigung mit 47/21-13, Test mit 119/16-30.34; H: Test mit BALB/c Aszites.

Tabelle 7. Reaktivität der monoklonalen Antikörper 47/21-13 und 119-16/13.34 und dem Alloantiserum T76 mit Zellen von Inzucht und B10.W Linien

Mauslinie	H-2 Komplex					Reaktivität		
	K	P	I	S	D	16/13.34	21-13	T76
B10	b	b	b	b	b	-	-	-
B10.D2	d	d	d	d	d	-	-	-
B10.P	p	p	p	p	p	+	+	+
B10.F(13R)	p	p	p	p	b	+	+	+
CHR51	d	d	p	p	w18	-	-	-
KEA5	d	p	p	p	w5	-	+	-
STC77	d	p	p	p	w17	-	+	-
SAA48	w3	p	p	p	w17	-	+	+
CAS2	w17	p	.	.	w3	-	+	-
STA39	w3	w13	w13	w13	w13	-	-	-

Wie die oben ausführlich dargestellten Kopräzipitationsversuche ergaben, lassen sich mindestens zwei 45000 Dalton große Glykoproteine aus den Zellmembranextrakten der Mäuselinien B10.F(13R) und SAA48 isolieren, deren Ausprägung von Genen der K Region kontrolliert wird. Es scheint daher naheliegend, neben dem K Locus noch einen zweiten Klasse-I Locus in der K Region anzunehmen. Dieser zweite Locus wird als H-2P bezeichnet.

Nimmt man an, daß der Antikörper mit einer Determinante des H-2P Allelproduktes reagiert und nicht mit einer Determinante des H-$2K^p$Glykoproteins, so läßt sich die Reaktivität mit Zellen von B10.P, C3H.NB, B10.F(13R), KEA5, STC77 und CHR51 (in der K Region identisch mit KEA5 und STC77, jedoch negativ mit dem Antikörper) auf folgende Weise erklären: Das K-Ende des H-2 Komplexes der Stämme KEA5, STC77 und CHR51 ist durch Rekombination zwischen $H\text{-}2^p$ und $H\text{-}2^d$Haplotypen entstanden, wobei das Crossing-over bei KEA5 und STC77 zwischen dem K- und dem P Locus stattfand, während es bei CHR51 zwischen dem P-und I-A Locus erfolgte (Tabelle 7).

Die positive Reaktivität des Antikörpers mit Zellen der Linien SAA48 und CAS2 kann auf die gleiche Weise erklärt werden: durch Rekombination erhielten sie das p-Allel für den H-2P Locus.

Klasse I Glykoproteine des K-Endes der Linien KEA5 und STC77 unterscheiden sich tatsächlich biochemisch (peptide mapping) von B10.D2; B. Arden (persönliche Mitteilung) konnte mit Hilfe chromatografischer Peptid-Analyse nachweisen, daß

KEA5 und STC77 sich in mindestens einem Peptid von B10.D2 unterscheiden. Da diese Untersuchungen mit Glykoproteinen durchgeführt wurden, die mit Alloantiseren gereinigt worden waren, ist es naheliegend, daß die Alloantiseren Antikörper gegen beide Genprodukte, H-2K und H-2P enthielten und somit nicht wirklich nur das K Allel verglichen wurde. Der gefundene Unterschied spiegelt daher das unterschiedliche P Allel wieder. Der geringe biochemische Unterschied (ein Peptid) weist dabei auf eine große Ähnlichkeit der beiden Gene bzw. ihrer Produkte hin.

Ein weiterer Hinweis für zwei Klasse I Loci in der K Region wurde kürzlich von Eskinazi et al. (83) berichtet. Die Autoren fanden mit Hilfe derselben hier angewandten sequentiellen Kopräzipitationstechnik zwei 45000 Dalton große Moleküle, die unterschiedlich mit monoklonalen Antikörpern bzw. Alloantiseren reagierten; in diesem Fall handelte es sich bei den von Eskinazi et al. beschriebenen Glykoproteinen um die des $H\text{-}2^k$ Haplotypes. Es ist sehr wahrscheinlich, daß es sich ebenfalls um Produkte des H-2P Locus handelt. Sollte dies der Fall sein, so weist dies auf einen polymorphen Locus mit mindestens drei Allelen hin: $H\text{-}2P^p$, $H\text{-}2P^k$ und $H\text{-}2P^d$.

3.2. S-D Region

Der monoklonale Antikörper 102/40-7 wurde durch die Immunisierung von (BALB/c x B10.F(13R))F_1 Mäusen mit Lymphozyten und Erythrozyten von B10.P Mäusen und anschließender Fusion der Milzzellen mit P-3 Myelomzellen hergestellt.
Der IgG2a, κ, Antikörper bindet Komplement und lysiert im zytotoxischen Test B- und T-Lymphozyten wie auch Thymozyten.
Das diesen Experimenten zugrunde liegende Ziel war, Antikörper gegen Erythrozyten-Antigene zu erhalten, deren Ausprägung von schon früher postulierten Genen zwischen der S- und D-Region kontrolliert wurden.
Die Kombination (BALB/c x B10.F(13R))F_1 anti-B10.P wurde gewählt, weil sie sich nur in der S-D Region des H-2 Komplex unterscheidet.

3.2.1. Zytotoxischer Test gegen Zellen von unabhängigen Inzuchtmäuselinien

Um das von dem Antikörper erkannte Antigen ausprägende Gen zu kartieren, wurde Gewebekulturüberstand im zytotoxischen Test gegen Zellen von unabhängigen und rekombinanten Mäuselinien untersucht. Tabelle 8 zeigt, daß Milzzellen von Mäusen mit den H-2 Haplotypen p, f und q lysiert werden.
Das das Antigen kontrollierende Gen muß sich entweder im H-2 Komplex befinden oder eng an ihn gekoppelt sein, da das Antigen unabhängig vom genetischen Hintergrund ausgeprägt wird (B10.P-, C3H.NB-Zellen reagieren positiv, B10- und C3H-Zellen negativ).
Gereinigte B-Zellen, gereinigte T-Zellen und Thymozyten von B10.P Mäusen werden ebenfalls hundertprozentig lysiert, wodurch ausgeschlossen werden kann, daß es sich bei dem Antigen um

Tabelle 8. Reaktivität des monoklonalen Antikörpers 102/4O-7 im zytotoxischen Test mit Lymphozyten von unabhängigen Inzuchtmäuselinien

Mauslinie	H-2 Haplotyp	Titer des Antikörpers 102/4o-7
B1O.D2	d	-
BALB/c	d	-
B1O.S	s	-
A.SW	s	-
B1O.M	f	:81[a]
A.CA	f	:81
B1O.Q	q	:81
DBA/1	q	:81
B1O	b	-
B1O.SM	v	-
B1O.PL	u	-
B1O.RIII	r	-
B1O.BR	k	-
CBA	k	-
B1O.P	p	:81
C3H.NB	p	:81
B1O.P T-Zellen	p	:81
B1O.P B-Zellen	p	:81
B1O.P Thymozyten	p	:81

[a]Letzte Verdünnung des Antiserums mit 100% Zellyse

ein Klasse II Molekül handelt.

3.2.2. Zytotoxischer Test gegen Lymphozyten von rekombinanten Inzuchtmäuselinien

Wie zu erwarten, reagierte der Antikörper nicht mit Zellen der Stämme B10.F(13R) (S^bD^b) und BALB/c (S^dD^d) (Tabelle 9); ebenso werden Zellen der Stämme B10.A (S^dD^d), A.TL (S^kD^d) und B10.AKM (S^kD^q) von dem Antikörper nicht lysiert. Da der Antikörper mit Zellen von B10.Q bzw. DBA/1 (S^qD^q) reagiert, aber nicht mit B10.AKM (S^kD^q),, kann das Antigen nicht von der H-2D-Region kontrolliert sein. Der Antikörper ist allerdings zytotoxisch für Zellen der Rekombinante B10.M(11R), (K^pD^d). Das Antigen kann aber auch nicht von der S Region kontrolliert sein, da der Antikörper Zellen des Stammes A.TFR1 (S^kD^f) lysiert, Zellen von A.TL (S^kD^d) und B10.AKM (S^kD^q) aber nicht.
Lymphozyten von B10.M(17R) (K^kD^f) werden hundertprozentig lysiert, allerdings ist der Titer des Antikörpers geringer als gegen B10.P.
Das gleiche gilt für B10.DA (K^qD^s) und für A.TFR2 (K^fD^d) Zellen, die nur zu 50% lysiert werden; der Antikörper weist gegen diese Zellen nur einen Titer von 1:2 auf. Lymphozyten von B10.AQR (K^qD^d) werden vollständig durch den Überstand lysiert, hingegen reagieren B10.QAR (K^kD^q) und B10.AKM (K^kD^q) Zellen negativ.
Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis dafür, daß die Spezifität nicht nur vom D-Ende kodiert wird.
Die positive Reaktion mit dem K^q Allel könnte durch eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit dem K-Molekül erklärt werden. Nach Absorption des Serums mit B10.AQR Lymphozyten verliert der Antikörper gegen Zellen von B10.M, B10.Q, B10.P und

Tabelle 9. Reaktivität des monoklonalen Antikörpers 102/40-7 im zytotoxischen Test mit Lymphozyten von rekombinanten Inzuchtmäuselinien

Mauslinie	H-2 Regionen						Titer des Antikörpers
	K	A	J	E	S	D	102/40-7
B10.F(13R)	p	p	p	p	b	b	-
B10.M(11R)	f	f	f	f	f	d	:81
B10.M(17R)	k	k	k	k	d	f	:27
B10.A	k	k	k	k	d	d	-
A.TL	s	k	k	k	k	d	-
B10.LG	d	f	f	f	f	.	-
A.TFR1	s	k	k	k	k	f	:81
A.TFR2	f	f	f	f	f	d	:2[a]
B10.DA	q	q	q	q	q	s	:27
B10.AKM	k	k	k	k	k	q	-
B10.A(2R)	k	k	k	k	d	b	-
B10.A(3R)	k	k	k	k	d	d	-
B10.WB	j	j	j	j	j	b	-
B10.AQR	q	k	k	k	d	d	:81
B10.QAR	k	k	k	k	q	q	-

[a]Kreuzreaktion: nur 50% der Zellen werden lysiert

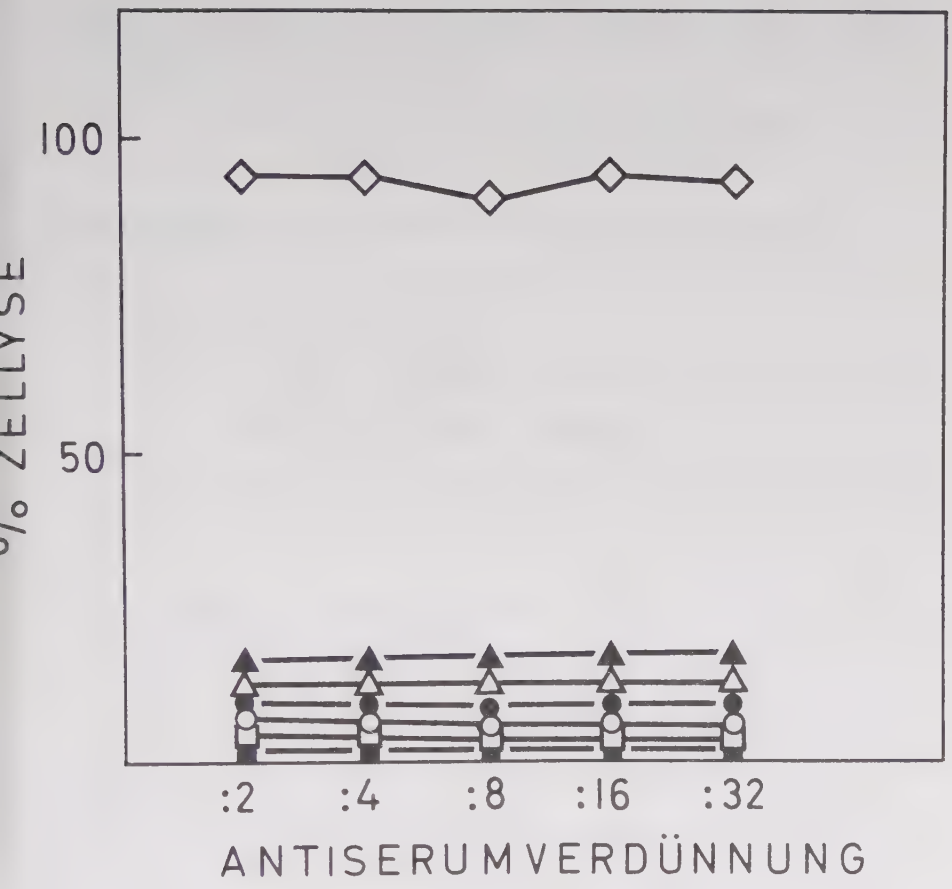


Abbildung 7. Zytotoxischer Test mit dem monoklonalen Antikörper 102/40-7 nach Absorption mit Zellen von B10.AQR gegen Lymphozyten von A.TFR1 (▲), B10.Q (△), B10.P (●), B10.M (o), CAA2 (□) und B10.AQR (■).
Als Kontrolle wurde der monoklonale Antikörper mit Zellen von B10.BR absorbiert und gegen Lymphozyten von B10.P ( ) getestet.

A.TFR1 Mäusen seine Aktivität (Abb. 7). Dies ist ein Hinweis dahin, daß sich in dem Überstand nur ein spezifischer Antikörper befindet, der gegen das S-D Ende des H-2 Komplexes gerichtet ist und mit dem K-Ende kreuzreagiert.

3.2.3. Zytotoxischer Test gegen Lymphozyten von 31 B10.W Linien

Weitere Untersuchungen mit dem Antikörper 102/40-7 wurden an allen vorhandenen B10.W Linien durchgeführt. Wie Tabelle 10 zeigt, lysiert der monoklonale Antikörper Zellen von sieben B10.W Mäuselinien, CAA2, STA10, STA12, LIB55, STA39, STA62 und SAA48. Soweit diese Linien bisher serologisch und biochemisch charakterisiert wurden, kann man aus diesem Ergebnis folgende Schlüsse ziehen.

1. CAA2 hat ein $H\text{-}2^f$ Allel in der K Region, ist in der I-Region identisch zu STC77 und CHR51 und ist $H\text{-}2^{w11}$ in H-2D. STC77 und CHR51 tragen gemäß biochemischer Analysen einen $H\text{-}2^p$ Haplotyp in der I-Region. Die positive Reaktion von CAA2 läßt sich demnach durch eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit dem K^f Allel oder durch die Existenz eines positiven Alleles in der S-D Region erklären.
2. STA10, STA12 und LIB55 sind im gesamten H-2 Komplex serologisch und biochemisch identisch und Zellen aller drei Linien werden von 102/40-7 lysiert.
3. STA39 ist aufgrund serologischer Typisierung in der I-Region identisch zu STA10, STA12 und LIB55 (alle vier Linien tragen ein w13 Haplotyp). STA39 hat in H-2D das Wildtypallel $H\text{-}2^{w3}$ und ist in der K Region identisch zu SAA48. Da diese Linie mit dem Antikörper ebenfalls positiv reagieren und sich auch in der S-D Region nicht von STA39 unterscheidet, handelt es sich entweder um eine Kreuzreaktion des Antikörpers über das K-Ende oder beide Mäuse haben das gleiche Allel in der S-D Region.

Tabelle 10. Reaktivität des monoklonalen Antikörpers 102/40-7 im zytotoxischen Test mit Lymphozyten von B10.W Mäuselinien

Mauslinie	H-2 Regionen			Titer des Antikörpers
	K	I	D	102/40-7
KPA42	v	v	w1	-
KPB132	v	v	w1	-
KPB68	w2	.	w2	-
SAA48	w3	w3	w3	:81
GAA20	w4	w4	w4	-
KEA5	d	.	w5	-
SNA70	k	k	w7	-
KEA2	w9	.	w9	-
SNA57	v	v	w10	-
DRB62	v	v	w10	-
WOA105	v	v	w10	-
CAA2	f	p	w11	:81
MOL1	k	k	w12	-
STA10	w13	w13	w13	:81
STA12	w13	w13	w13	:81
LIB55	w13	w13	w13	:81
STC77	d	p	w18	-
STC90	w15	w15	w15	-
BUA1	w16	w16	k	-
CAS2	w17	.	w17	-
CHR51	d	p	w18	-
GAA37	s	s	w21	-
CAS1	w23	w23	w23	-
KPB128	s	s	b	-
LIB18	w16	w16	w18	-

Tabelle 10. Fortsetzung

BUA16	w16	w16	k	-
KPA44	d	w16	w16	-
STA39	w3	w13	w13	:81
STA62	w27	b	w27	:81
CHA2	g	k	w26	-

3.2.4. Diskussion

Faßt man die Daten dieses Kapitels zusammen, so ergibt sich, daß der monoklonale Antikörper an ein Molekül bindet, das von der S-D Region des H-2 Komplexes kodiert wird. Dieses Antigen läßt sich auf B-, T-Lymphozyten und Thymozyten nachweisen und damit möglicherweise den Klasse I Produkten zuordnen (Klasse II Moleküle werden nicht auf B-Zellen exprimiert und Klasse III nicht auf B-Lymphozyten und Thymozyten). Gegen die Möglichkeit, daß das Molekül, an das der monoklonale Antikörper bindet, von der Region rechts von H-2D, Qa-1, Qa-2, Qa-3 und Tla, kodiert wird, spricht sowohl einerseits, daß die positiven Mauslinien keine Allele dieser Loci gemein haben (8ℰ) und diese Antigene nur auf Subpopulationen von Lymphozyten ausgeprägt werden, als auch die Untersuchung der H-2D-End Rekombinanten (Tabelle 11): Die Rekombinante B10.M(11R) hat in der H-2D Region ein für den monoklonalen Antikörper negatives Allel ($H\text{-}2^d$), reagiert jedoch positiv mit dem Antikörper. In diesem Fall stimmt die H-2D Aktivität nicht mit der H-2"X" Aktivität des Antikörpers überein (H-2"X" dient hier als vorläufige Bezeichnung des Locus, der für das 102/40-7 positive Molekül in der S-D Region kodierte). Die Rekombinante B10.M(11R) trennt H-2"X" von H-2D, wobei die Rekombinantionstelle unmittlebar links von H-2D liegt. Für die Mäuselinien B10.M(17R) und A.TFR1, die identische H-2"X" und H-2D Allele besitzen, liegt die Rekombinationsstelle näher an der S-Region (Tabelle 11).

Diese Ergebnisse zeigen, daß dieser H-2"X" Locus, der möglicherweise für ein Klasse I Molekül kodiert, in der S-D Region des H-2 Komplexes liegt. Ein weiterer Hinweis, daß es sich bei der Spezifität des monoklonalen Antikörpers um ein Klasse I Antigen handelt, ist die serologische Kreuzreaktion mit einem

Tabelle 11. Definition der H-2X Allele der in dieser Arbeit erwähnten Inzuchtmäuse

Mauslinie	H-2 Regionen						
	K	A	J	E	S	X	D
B10	b	b	b	b	b	b	b
B10.D2	d	d	d	d	d	d	d
B10.Q	q	q	q	q	q	q	q
B10.S	s	s	s	s	s	s	s
B10.P	p	p	p	p	p	p	p
B10.BR	k	k	k	k	k	k	k
B10.M	f	f	f	f	f	f	f
B10.SM	u	u	u	u	u	u	u
B10.PL	v	v	v	v	v	v	v
B10.RIII	r	r	r	r	r	r	r
B10.F(13R)	p	p	p	p	b	b	b
B10.M(11R)	f	f	f	f	f	f	d
B10.M(17R)	k	k	k	k	d	f	f
B10.A	k	k	k	k	d	d	d
A.TL	s	k	k	k	k	k/d	d
B10.LG	d	f	f	f	f	.	.
A.TFR1	s	k	k	k	k	f	f
A.TFR2	f	f	f	f	f	d	d
B10.DA	q	q	q	q	q	q	s
B10.AKM	k	k	k	k	k	k	q
B10.(2R)	k	k	k	k	d	d/b	b
B10.A(3R)	k	k	k	k	d	d	d
B10.WB	j	j	j	j	j	j/b	b
B10.AQR	q	k	k	k	d	q	d
B10.QAR	k	k	k	k	q	q	q

Molekül in der K-Region. Die Rekombinante B10.AQR ($K^qI^kD^d$) besitzt nur in der K-Region ein 102/40-7 positives Allel, K^q, in der I-Region kodieren Allele des Haplotypes $H\text{-}2^k$, ein 102/40-7 negatives Allel, die Klasse II Antigene.

Die einzigen Klasse I Moleküle, die bisher sowohl serologisch als auch biochemisch in der K Region identifiziert wurden, sind H-2K und H-2P. Die serologische Kreuzreaktion des monoklonalen Antikörpers 102/40-7 findet möglicherweise mit dem Produkt eines K^q oder P^q Allels statt.

Nachdem erwisen ist, daß das H-2"X" Molekül nicht von einem H-2D Allel kodiert wird, ergibt sich die Frage, ob es sich um das Produkt eines noch nicht beschriebenen neuen Gens oder eines Allel schon bekannter Loci in der D Region handelt. Démant et al. publizierten 1975 Daten über die Existenz eines neuen Klasse I Locus (H-2L) in der D-Region (53), der einen ähnlichen Polymorphismus wie die H-2K und D Loci aufweist (57, 58). Dieser H-2L Locus konnte bisher durch keine Rekombinante von H-2P getrennt werden (58), was auf eine enge Bindung dieser Loci hinweist. Wie zwischen H-2"X" und einem Molekül in der K-Region finden zwischen H-2L, H-2D und H-2K Kreuzreaktionen der Antiseren statt: Démant et al. (84) veröffentlichten 1978, daß Alloantikörper in einem Antiserum gegen H-2.2P (Determinante auf H-2L), die mit den $H\text{-}2D^k$ und $H\text{-}2K^d$ Molekülen reagierten, nach Absorption mit $H\text{-}2D^k$ oder $H\text{-}2K^d$ Lymphozyten noch mit $H\text{-}2L^d$ und $H\text{-}2L^q$ reagierten.

Die Autoren interpretierten ihre Daten dahingehend, daß einige Spezifitäten der H-2.28 Antigen-"Familie" auf H-2D und H-2L Molekülen vorkommen, andere von H-2K und H-2L Antigenen geteilt werden. Die Spezifitäten der H-2.28 "Familie" werden demnach von drei verschiedenen Loci determiniert: H-2K, H-2D und H-2L. Das gleiche trifft für einige antigene Determinanten die gemeinsam

auf H-2K und H-2D Molekülen vorhanden sind: Antiseren, die gegen eine Region produziert worden waren, zeigten serologische Kreuzreaktion gegen die andere Region des H-2 Komplexes (7). Um die Kreuzreaktion zwischen H-2L, H-2K und H-2D zu erklären, diskutierte Démant zwei Möglichkeiten: erstens, die verschiedenen Moleküle des H-2 Komplexes werden von Genen kontrolliert, die durch Multiplikation und Mutationen von einem gemeinsamen Urgen entstanden und zwangsläufig homologe Strukturen aufweisen. Zweitens, die beiden Klassen von antigenen Determinanten, private und publike Spezifitäten, werden von getrennten Genen kontrolliert und die Zusammensetzung eines H-2K oder H-2L Moleküls findet in einer Interaktion der Gene oder der Produkte statt. Die Gene für die privaten Spezifitäten könnten z.B. alle in einer Region des H-2 Komplexes vorhanden sein und werden für die Synthese einiger oder aller Arten von H-2 Molekülen genutzt, oder die Gene für die publiken und privaten Determinante liegen nebeneinander.

Der extreme Polymorphismus der H-2 Gene könnte demnach durch eine Kontrolle über die Expression und Zusammensetzung der verschiedenen Gene und nicht durch eine Vielzahl von Allelen eines Locus entstehen.

Falls der monoklonale Antikörper 102/40-7 an eine Determinante auf einem H-2L^{p} oder H-2L^{q} Molekül bindet und nicht an das Produkt eines neuen H-2"X" Gens, so kann man den L Locus zwischen die S und D Region kartieren, was bisher nicht möglich war, da keine Rekombinante L von D trennte.

Ivanyi und Démant gaben kürzlich serologische Hinweise auf die Existenz weiterer Moleküle, die von der D Region kodiert werden. Capping Experimente mit Antiseren gegen die private Spezifität von H-2D^{d}, H-2.4, und gegen die Spezifitäten der H-2.28 Antigen-Komponenten zeigten, daß ein drittes Molekül, H-2M, unterschied-

lich zu H-2D und H-2L exprimiert wird, das die private Spezifität H-2.4 besitzt aber einige publike Determinanten, die charakteristisch für H-2D sind, nicht teilt (86).

Dieses H-2.M Molekül konnte in den Haplotypen d, dm2 (BALB/c-H-2^{dm2}), jedoch nicht in der Mutante dm1 (BALB/c-H-2^{dm1}) nachgewiesen werden (55, 56).

Weitere Capping Experimente von Ivanyi und Démant mit Antiseren gegen die privaten Spezifitäten von H-$2K^d$ (H-2.31) und H-$2D^k$ (H-2.32) und gegen publike Antigene dieser Moleküle ergaben, daß nach Capping mit anti-publiken Seren die anti-privaten Seren noch an die Zellen banden.

Die Autoren schliessen daraus, daß es zwei Arten von K^d Molekülen und zwei Arten von D^k Molekülen gibt, die jeweils mit den privaten anti-K^d oder anti-D^k Seren reagieren. Die ersten zwei, H-$2K1^d$ und H-$2D1^k$, binden Antiseren gegen die privaten und alle publiken Spezifitäten, die charakteristisch für K^d und D^k sind. Die anderen beiden Moleküle, H-$2K2^d$ und H-$2D2^k$, binden zwar die Antiseren gegen die privaten Spezifitäten, jedoch nicht alle gegen die für diese Allele charakteristischen publiken Determinanten (87).

Ob diese "neuen" Moleküle von "neuen" H-2 Loci in der K und D Region des H-2 Komplexes kodiert werden, oder ob es sich um Allele schon bekannter Loci handelt (K, P, D, L) kann erst geklärt werden, wenn geeignete Rekombinanten und biochemische Daten zur Verfügung stehen. Der einzige Hinweis für Ivanyi und Démant, daß es sich bei H-2M um einen neuen Locus handeln könnte, ist, daß H-$2M^d$ in der Mutante BALB/c-H-2^{dm1} nicht vorhanden ist (siehe H-$2L^d$, das in der Mutante BALB/c-H-2^{dm2} fehlt).

Ein weiteres H-2 Molekül wurde kürzlich von Hansen et al. beschrieben (88), das in der D-Region der Haplotypen H-2^d und H-2^q neben D, L und M exprimiert wird. Dieses Molekül fehlt wie

H-2L in der Mutante BALB/c-H-2^{dm2}, ist jedoch, im Gegensatz zu H-2M, in der Mutante BALB/c-H-2^{dm1} vorhanden.

Hansen et al. verwendeten für ihre serologischen und biochemische Experimente zwei monoklonale Antikörper, die gegen H-$2L^d$ Moleküle Aktivität besitzen, da sie für BALB/c Zellen zytotoxisch sind, für BALB/c-H-2^{dm2} nicht (H-2^{dm2} ist H-2L negativ) und die die Spezifitäten H-2.64 und H-2.65 haben. Um die Moleküle, an die diese Antikörper binden, näher zu charakterisieren, wurden sequentielle Kopräzipitation mit löslichen B10.A (K^kD^d) Antigenen durchgeführt. Nach Entfernen aller H-2.65 positiven Moleküle wurden von dem zweiten Antikörper (anti H-2.64) noch weitere Antigene mit einem Molekulargewicht von 45 000 Dalton präzipitiert. Im umgekehrten Experiment, nach Vorreinigung der H-2.64 positiven Moleküle, konnten vom zweiten Antikörper keine H-2.65 positiven Antigene präzipitiert werden. Diese Ergebnisse weisen zumindest auf zwei Populationen von Molekülen in der D-Region hin: H-2.64^+, H-2.65^+ (H-$2L^d$) und H-2.64^+, H-2.65^- (H-2R). Das gleiche Experiment wurde mit B10.AKM Antigenen (K^kD^q) durchgeführt und ergab das gleiche Ergebnis. Insgesamt konnten die Autoren von B10.A und B10.AKM Zellen jeweils vier Klasse I Moleküle isolieren (K^k, D^d, L^d, R^d und K^k, D^q, L^q, R^q).

Neben H-2K und H-2D wurden demnach bisher sowohl serologisch als auch biochemisch drei weitere Klasse I Loci charakterisiert, H-2P, H-2L und H-2R. Die Moleküle H-$2K2^d$ und H-$2D2^k$ könnten von Allelen dieser Loci kodiert werden und falls es sich bei H-2M möglicherweise um einen zu D, L und R unterschiedlichen Locus handelt, könnte H-$2D2^k$ von einem Allel dieses Gens kodiert werden. Um die Frage beantworten zu können, ob es sich bei H-2"X" um ein zusätzliches Gen in der D Region handelt, oder ob H-2"X" ein Allel von L, R (oder M) darstellt, kann erst durch geeignete Rekombinanten und biochemische Untersuchungen geklärt

werden. Falls es sich um ein Allel, R oder M, handelt, können diese Loci, wie L, zwischen die S-D Region des H-2 Komplexes kartiert werden.

Eine Korrelation von H-2"X" mit dem von O'Neill und Parish (85) beschriebenen H-2U Locus zwischen der S und D Region kann nicht hergestellt werden, da von H-2U ein Molekül kodiert wird, das vorwiegend auf B-Lymphozyten ausgeprägt wird, während der Antikörper 102/40-7 B- und T-Lymphozyten und Thymozyten lysiert. Bei dem H-2U Molekül handelt es sich möglicherweise um ein Klasse II Antigen.

3.3. I und H-2D Region

Die Fusion 47 wurde durchgeführt, um monoklonale Antikörper gegen das Blutgruppenantigen H-2.7 zu erhalten, das von der Ss Region codiert wird und eine Determinante auf C4d ist (45, 48). Wie schon in Material und Methoden erwähnt, richteten sich die Immunisierungen in diesem Fall gegen den gesamten H-2 Komplex. Drei Hybridlinien konnten isoliert werden, von denen in diesem Kapitel zwei näher charakterisiert werden sollen. Die Hybridome 47/36-9 und 47/42-2 sezernierten jeweils neben den unspezifischen IgG1 der P-3 Myelomzelle einen spezifischen Antikörper der Klassen IgG1, κ, und IgG2a, κ. Da Antikörper der IgG1 Klasse kein Komplement fixieren, wurden alle Untersuchungen mit 47/31-9 im PVP-Hämagglutinationstest durchgeführt, während der Antikörper 47/42-2 im Zytotoxitätstest charakterisiert werden konnte.

3.3.1. Zytotoxitäts- und PVP-Hämagglutinationstest gegen Lymphozyten und Erythrozyten von unabhängigen und rekombinanten Inzuchtmäuselinien

Um die Spezifität der beiden oben erwähnten Antikörper zu kartieren, wurden die Gewebekulturüberstände im Zytotoxitäts- und PVP-Hämagglutinationstest gegen Zellen von unabhängigen und rekombinanten Inzuchtmäuselinien getestet.
Wie in Tabelle 12 und 13 zu sehen ist, lysiert der Antikörper 47/42-2 Lymphozyten der unabhängigen Haplotypen $H\text{-}2^p$ (C3H.NB und B10.P und B10.Q ($H\text{-}2^q$) und der Rekombinanten B10.F(13R) bis zu 50%. Nach Entfernen der T-Zellen durch anti Thy-1 Serum werden die verbleibenden (B-) Lymphozyten 100%-ig lysiert, was darauf hinweist, daß der monoklonale Antikörper an ein Antigen bindet, das nur auf B-Zellen ausgeprägt wird.

Tabelle 12. Reaktivität der monoklonalen Antikörper 47/42-2 und 47/36-9 mit Lymphozyten und Erythrozyten von unabhängigen Inzuchtmäuselinien

Mauslinie	H-2 Haplotyp	Titer der Antikörper	
		47/42-2[a]	47/36-9[b]
B10.D2	d	-	-
BALB/c	d	-	-
B10.S	s	-	-
A.SW	s	-	-
B10.M	f	-	-
A.CA	f	-	-
B10.P	p	:80	:80
C3H.NB	p	:80	:80
B10.Q	q	:80	-
DBA/1	q	:80	-
B10	b	-	-
B10.SM	v	-	-
B10.PL	u	-	-
B10.BR	k	-	-
CBA	k	-	-
C3H	k	-	-

[a]Der Antikörper wurde im zytotoxischen Test untersucht

[b]Der Antikörper wurde im PVP-Hämagglutinationstest untersucht

Tabelle 13. Reaktivität der monoklonalen Antikörper 47/42-2 und 47/36-9 mit Lymphozyten und Erythrozyten von rekombinanten Inzuchtmäuselinien

Mauslinie	H-2 Regionen	Titer der Antikörper	
	K A I E S D	47/42-2	47/36-9
B10.F(13R)	p p p p b b	:80	-
B10.M(11R)	f f f f f d	-	-
B10.M(17R)	k k k k d f	-	-
B10.A	k k k k d d	-	-
A.TL	s k k k k d	-	-
B10.LG	d f f f f .	-	-
A.TFR1	s k k k k f	-	-
A.TFR2	f f f f f d	-	-
B10.DA	q q q q q s	:80	-
B10.AKM	k k k k k q	-	-
B10.A(2R)	k k k k d b	-	-
B10.A(3R)	k k k k d d	-	-
B10.WB	j j j j j b	-	-
B10.AQR	q k k k d d	-	-
B10.QAR	k k k k q q	-	-

Klasse II Moleküle werden vornehmlich auf B-Zellen ausgeprägt, und die einzige publike Determinante, die von den Haplotypen $\underline{H\text{-}2^p}$ und $\underline{H\text{-}2^q}$ geteilt wird, ist die Spezifität Ia.13 (88).

Der Überstand des Antikörpers 47/36-9 agglutiniert nur Erythrozyten des Donors B10.P ($\underline{H\text{-}2^p}$) und ist negativ gegen Zellen der Rekombinante 13R, wodurch die Spezifität zu D-Ende des H-2 Komplexes kartiert wird. Möglicherweise handelt es sich um die private Determinante des H-2D Antigens, H-2.22.

3.3.2. Zytotoxischer und PVP-Hämagglutinationstest gegen Lymphozyten und Erythrozyten von B10.W Linien

Von den 31 getesteten B10.W Linien reagierten fünf positiv mit dem monoklonalen Antikörper 47/42-2. Der Vergleich mit dem Alloantiserum Ia.13 zeigt, daß beide Antiseren identisch reagieren (Tabelle 14). Dieses Ergebnis ist ein gutes Beispiel dafür, daß Determinanten, die mit komplexen Alloantiseren definiert wurden, durch monoklonale Antikörper bestätigt werden können.

Tabelle 14. Reaktivität der monoklonalen Antikörper 47/42-2 und 47/36-9 und des Alloantiserums anti Ia13 mit Zellen von B10.W Mäuselinien

Mauslinie	H-2 Regionen			Titer der Antikörper		
	K	I	D	47/42-2	Allo Ia13[a]	47/36-9
KPA42	v	v	w1	-	-	-
KPB132	v	v	w1	-	-	-
KPB68	w2	.	w2	-	-	-
SAA48	w3	w3	w3	:40	+	-
GAA20	w4	w4	w4	-	-	-
KEA5	d	.	w5	:40	+	-
SNA70	k	k	w7	-	-	-
KEA2	w9	.	w9	-	-	-
SNA57	v	v	w10	-	-	-
DRB62	v	v	w10	-	-	-
WOA105	v	v	w10	-	-	-
CAA2	f	p	w11	:40	+	-
MOL1	k	k	w12	-	-	-
STA10	w13	w13	w13	-	-	-
STA12	w13	w13	w13	-	-	-
LIB55	w13	w13	w13	-	-	-
STC77	d	p	w18	:40	+	-
STC90	w15	w15	w15	-	-	-
BUA1	w16	w15	k	-	-	-
CAS2	w17	.	w3	:40	+	-
CHR51	d	p	w18	-	-	-
GAA37	s	s	w21	-	-	-
CAS1	w23	w23	w23	-	-	-
KPB128	s	s	b	-	-	-

Tabelle 14. Fortsetzung

LIB18	w16	w16	w8	-	-	-
BUA19	w16	w16	k	-	-	-
BUA16	w16	w16	k	-	-	-
KPA44	d	w16	w24	-	-	-
STA39	w3	w13	w13	-	-	-
CHA2	q	k	w26	-	-	-
STA62	w27	b	w27	-	-	-

a) biochemisch bestimmt mit multispezifischen Allo Ia.13

3.3.3. Diskussion

Die monoklonalen Antikörper 47-36.9 und 47-42.2 weisen eine Determinanten-Spezifität auf, die mit der von absorbierten Alloantiseren identisch ist: H-2.22 und Ia.13. In eigenen vorausgegangenen Untersuchungen (Vollmers et al. (42) und Götze und Vollmers (43)) mit anderen monoklonalen Antikörpern fand sich, daß in vielen Fällen, in denen identische Reaktionen zwischen Alloantiseren und monoklonalen Antikörpern bei Testung von Inzuchtlinien (und B10.W Linien) gefunden werden, doch deutliche Unterschiede in der Reaktion gegen Zellen unverwandter Wildmäuse auftraten. Solche vergleichenden Untersuchungen konnten für die beiden oben genannten Antikörper nicht durchgeführt werden, da keine der über 500 getesteten Wildmäuse H-2.22 (mit Alloantiserum typisiert) besaß, bzw. ein gereinigtes Alloantiserum mit der Spezifität Ia.13 nicht zur Verfügung stand.
Identität der Reaktivität von monoklonalen Antikörpern und Alloantiseren innerhalb der begrenzten Zahl von Inzuchtlinien und von ihnen abgeleiteten Rekombinantenlinien bedeutet jedoch nicht unbedingt, daß gleiche Determinanten am gleichen Molekül charakterisiert werden - wie am Beispiel des Antikörpers 47-21.13 (s.S. 57, 3.1.6.) demonstriert werden konnte. Solche Reaktionsunterschiede können auf folgenden Ursachen beruhen:

1. Die von H-2 Genen ausgeprägten Moleküle besitzen mehrere unterschiedliche Strukturen, die von verschiedenen Antikörpern erkannt werden können. Gleiche Strukturen (Determinanten) können bei verschiedenen Allel-Produkten des gleichen Locus auftreten, in Kombination mit jeweils anderen. Ein Alloantiserum enthält eine heterogene Gruppe von Antikörpern, die jeweils Spezifität für eine bestimmte Determi-

nante haben. Die Reaktivität gegen das Allelprodukt , gegen welches es hergestellt wurde, ist das Ergebnis der Reaktion aller Antikörper in dem Alloantiserum mit allen Determinanten des H-2 Moleküls. Ist an einem Molekül nur eine Determinante vorhanden, so daß auch nur eine Antikörper-Population mit Spezifität für diese Determinante reagieren kann, so ist diese Reaktion zu gering, als daß sie unter gleichen Testbedingungen als positiv erkannt wird-die Reaktion ist also negativ.

Man sollte daher erwarten, daß die Häufigkeit von positiven Reaktionen von Alloantiseren geringer ist als die von monoklonalen Antikörpern; dies hat man auch tatsächlich gefunden (44).

Für die oben angeführte Möglichkeit spricht auch, daß man bei Anwendung empfindlicher Nachweismethoden auch mit Alloantiseren eine häufigere positive Reaktivität nachweisen kann, und daß Alloantiseren, die mit bestimmten Zellen im direkten Test keine eindeutig positive Reaktion aufweisen, mit denen aber monoklonale Antikörper positiv reagieren, nach Absorption mit diesen Zellen eine abgeschwächte Reaktion mit sonst positiven Zellen aufweisen (d.h. die zur Absorption benutzten Zellen besaßen eine oder mehrere von Antikörpern im Alloantiserum erkennbare Determinanten).

2. Prinzipiell liegt eine ähnliche Situation vor, wenn es sich um Determinanten an unterschiedlichen Molekülen handelt, die von zwei sehr eng gekoppelten Genen ausgeprägt werden. Innerhalb der Inzuchtlinien können sie, sofern keine Rekombinante vorliegt, nicht unterschieden werden und verhalten sich als ein von einem Gen kontrollierter Phänotyp: das Alloantiserum reagiert mit z.B. A und der monoklonale Antikörper mit B; da aber in Inzuchtlinien nur die Kombination

A-B vorkommt, nicht aber X-B bzw. A-X, bilden A-B eine Einheit. Erst Populationsuntersuchungen, sofern kein sehr starkes Kopplungsungleichgewicht zwischen A und B vorliegt, lassen erkennen, daß es sich um Moleküle zweier unabhängiger Gene handelt. Ein Beispiel hierfür sind die unter 3.1. aufgeführten Befunde.

3.4. S Region: C4b

Durch die Fusion von P-3 Myelom- mit Milzzellen von A.SW Mäusen, die mit A.CA Con A Blasten immunisiert worden waren, wurden vier Hybridlinien etabliert: 112/10-19, 112/15-16, 112/39-2 und 112/38-12.
Die Hybridome sezernieren spezifische Antikörper folgender Klassen: IgG1, κ, IgG2a, κ, IgG1, κ und IgG1, κ. Alle Tests wurden im Radioimmunoassay mit T-Zellen und im PVP-Hämagglutinationstest durchgeführt, da die vier Antikörper nicht zytotoxisch reagierten.
In diesem Kapitel werden die ersten drei monoklonalen Antikörper besprochen, die Antigendeterminanten des gleichen Moleküls erkennen, der Komplementkomponente C4b, während 112/38-12 vermutlich eine Determinante des C4 Bindungsprotein erkennt und unter 3.5 besprochen wird.
Alle Analysen wurden in beiden Testsystemen durchgeführt und die Ergebnisse stimmten jedesmal überein. Daher wurden in einigen Tabellen der Einfachheit halber nur die Ergebnisse eines Testes aufgeführt.

3.4.1. Reaktivität der monoklonalen Antikörper mit Zellen von Inzucht- und kongenen Mäuselinien

Die Typisierung von Mäusen mit "Labor" (Tabelle 15) und "wild" H-2 Haplotypen (Tabelle 16) ließ den Schluß zu, daß alle drei Antikörper antigene Determinanten entdecken, die von Genen auf dem 17. Chromosom kodiert werden. Dieses Ergebnis wurde erwartet, denn die Stämme, die für Immunisierungen verwendet wurden, A.CA und A.SW, unterschieden sich nur im H-2 Komplex. In allen Fällen, in denen die getesteten

Tabelle 15. Reaktivität der monoklonalen Antikörper 112/10-19, 112/15-16 und 112/39-2 mit Erythrozyten und T-Zellen von unabhängigen und rekombinanten Inzuchtmäuselinien

Mauslinie	H-2 Regionen	Reziproker Antikörpertiter					
	K A J E S D	112/10-19		112/15-16		112/39-2	
		RIA[a]	PVP[b]	RIA	PVP	RIA	PVP
B10,A.BY	b b b b b b	60	80	-	-	-	-
B10.D2,BALB/c	d d d d d d	60	80	60	80	60	80
B10.M,A.CA	f f f f f f	60	80	60	80	60	80
B10.WB	j j j j j b	60	80	60	80	60	80
B10.Q,DBA/1	q q q q q q	60	40	60	60	60	80
B10.P,C3H.NB	p p p p p p	40	80	60	80	60	80
B10.BR,CBA	k k k k k k	-	-	-	-	-	-
B10.S,A.SW	s s s s s s	-	-	-	-	-	-
B10.PL	u u u u u u	-	-	60	80	80	80
B10.SM	v v v v v v	40	80	60	80	60	80
B10.RIII	r r r r r r	-	-	60	80	40	80
C3H.OH	d d d d d k	60	80	60	80	60	80
C3H.OL	d d d d k k	-	-	-	-	-	-
B10.A	k k k k d d	60	80	60	80	80	80
A.AL	k k k k k d	-	-	-	-	-	-
B10.S(8R)	k k . . s s	-	-	-	-	-	-
B10.S(9R)	s s k k d d	40	80	40	80	60	80
B10.HTT	s s k k k d	-	-	-	-	-	-
A.TFR1	s k k k k f	-	-	-	-	-	-
B10.M(11R)	f f f f d d	60	80	80	80	60	60
B10.M(17R)	k k k k d f	60	80	60	80	60	80

Tabelle 15. Fortsetzung

B10.F(13R)	p	p	p	p	b	b	60	80	-	-	-	-
B10.GD	d	d	d	d	b	b	60	80	-	-	-	-
B10.A(3R)	b	b	b	k	d	d	40	80	60	80	40	80
B10.A(5R)	b	b	b	k	d	d	40	80	60	80	40	80
A.TH	s	s	s	s	s	d	-	-	-	-	-	-
A.TBR1	b	b	b	b	b	d	-	-	-	-	-	-

[a] Radioimmunoassay

[b] PVP-Hämagglutinationstest

Tabelle 16. Reaktivität der monoklonalen Antikörper 112/10-19, 112/15-16 und 112/39-2 im PVP-Hämagglutinationstest gegen Erythrozyten von B10.W Mäuselinien

Mauslinie	H-2 Regionen				Titer der Antikörper		
	K	I	S	D	112/10-19	112/15-16	112/39-2
SNA70	k	k	w8	w8	-	-	-
KPA44	d	.	.	w9	:60	:40	:80
STC90	w15	w15	.	w15	:60	:40	:80
CAS1	w23	.	.	w23	:60	:40	:80
CHA2	q	k	w26	w26	-	-	-
SAA48	w3	w3	w3	w3	-	-	-
CAA2	f	p	.	w11	:40	:60	:80
STA62	w27	b	w27	w27	:40	:40	-
STC77	d	p	.	w18	:40	:60	:80
CHR51	d	p	.	w18	:40	:60	:80
BUA1	w16	w16	w16	k	:60	:60	:60
BUA16	w16	w16	w16	k	:60	:60	:60
SNA57	v	v	w10	w10	:40	:40	:40
BUA19	w16	w16	w16	k	:60	:60	:60
DRB62	v	v	w16	w16	:40	:40	:40
WOA105	v	v	w10	w10	:40	:40	:40
KPA42	v	v	w1	w1	-	-	-
STA10	w13	w13	.	w13	-	-	-
STA12	w13	w13	.	w13	-	-	-
LIB55	w13	w13	.	w13	-	-	-
GAA20	w4	w4	.	w4	-	-	-
KEA5	d	.	.	w5	-	:60	:60
MOL1	k	k	.	w12	-	-	-
CAS2	w17	.	.	w17	:60	:40	:40

Zellen von Mäuse mit identischen H-2 Haplotypen stammen, einen aber unterschiedlichen genetischen Hintergrund besitzen, ist die Reaktivität der Antikörper mit dem H-2 Haplotyp assoziert. Tabelle 16 zeigt außerdem, daß Zellen von einigen unabhängig entstandenen B10.W Linien mit serologisch identischem H-2 Haplotyp (die Linien STC77 und CHR51, BUA1, BUA16 und BUA19, SNA72, DRB62 und WOA105, STA10, STA12 und LIB55, siehe Ref. 41-44) in gleicher Weise mit den monoklonalen Antikörpern reagieren. Die Ergebnisse in Tabelle 15 und 16 lassen den Schluß zu, daß die Antikörper H-2 kodierte Determinanten erkennen. Die Antikörper 15-16 und 39-2 zeigen identische Reaktionen gegen Zellen von Mäusen mit "Labor"-H-2 Haplotypen, weisen jedoch unterschiedliche Reaktionen gegen Zellen von B10.W Linien (Tabelle 16) auf.
Alle drei monoklonalen Antikörper binden deshalb wahrscheinlich an unterschiedliche Determinanten. Im unteren Teil von Tabelle 15 sind die Ergebnisse der Typisierung von einigen H-2 rekombinanten Inzuchtlinien angegeben. Die monoklonalen Antikörper 112/10-19, 112/15-16, 112/39-2 entdecken Determinanten, die von der S Region im H-2 Komplex codiert werden.

	K	I	S	D	Bindung
C3H	k	k	k	k	-
DBA/2	d	d	d	d	+
C3H.OH	d	d	d	k	+
C3H.OL	d	d	k	k	-
B10.A, A	d	d	d	d	+
A.AL	k	k	k	d	-

Tabelle 17. Quantitative Absorption der monoklonalen Antikörper 112/10-19, 112/15-16 und 112/39-2

Absorbiert von	Getestet an	Hämagglutinationsaktivität von 112/10-19	112/15-16	112/39-2
B10	A.CA	.[a]	[b]4443-[c]	4342-
B10.BR	A.CA	4433-	3444-	4433-
B10.S	A.CA	4444-	3343-	3323-
B10.PL	A.CA	4432-	.	.
B10.SM	A.CA	4333-	.	.
A.CA	A.CA	-----	-----	-----

[a] Nicht getestet

[b] Die erste Zahl gibt die Stärke der Agglutination in einer Verdünnung des Antikörpers von 1:10 an. Die weiteren Verdünnungen sind entsprechend 1:20, 1:40 und 1:80. Die Zahl - 4 - gibt die stärkste Agglutination der Erythrozyten an, - bedeutet keine Reaktion.

[c] Kontrolle mit PVP-PBS-BSA Lösung

3.4.2. Absorptionen

Mit Zellen der Inzuchtlinien, die im direkten PVP- oder Radioimmunotest negativ mit den drei monoklonalen Antikörpern reagierten, wurden Absorptionen durchgeführt. 50 µl Antikörper-Lösung wurden mit 2 x 10^8 Lymphozyten und Erythrozyten inkubiert und der nach Abzentrifugieren der Zellen erhaltene Überstand anschließend im PVP-Test gegen A.CA Erythrozyten getestet. Tabelle 17 zeigt, daß die im direkten Test negativen Zellen auch nicht die Fähigkeit besitzen, die Antikörper zu binden (absorbieren).

3.4.3. Gewebeverteilung der Determinanten

Die Antigene, die von den drei monoklonalen Antikörpern entdeckt werden, haben die gleiche Gewebeverteilung: Die Antikörper banden sich an T-Lymphozyten, nicht dagegen an B-Lymphozyten oder Thymozyten, an Con A- oder MLC-stimulierte, aber nicht an LPS-stimulierte Blasten und an Erythrozyten (Tabelle 18). Die Reaktivität des Antikörpers gegen T-Zellen weist gelegentliche Titervariationen im PVP oder Radioimmunotest auf. Bei Blasten sind diese Variationen noch stärker ausgeprägt. Die Stärke der Antikörperbindung variiert so stark, daß in einigen Fällen Blasten von positiven Linien im direkten Test keine Antikörper binden.

3.4.4. Präsenz der Antigene in Serum und Plasma

Die Kartierung der Loci in der S Region und die Gewebeverteilung der Determinanten legte die Vermutung nahe, daß die Antikörper Variationen in C4 Fragmenten und C4-assoziierten Proteinen entdecken. Die Variabilität der Antikörper-Bindung

Tabelle 18. Reaktivität der monoklonalen Antikörper 112/10-19, 112/15-16 und 112/39-2 im Radioimmunoassay mit Zellen verschiedener Gewebe von unabhängigen Inzuchtmäuselinien

Gewebe	Maus-linie	H-2 Haplotyp	Titer der Antikörper 112/10-19	112/15-16	112/39-2
ConA Blasten	B10	b	:100	-	-
	B10.D2	d	:80	:80	:80
	BALB/c	d	:80	:80	:80
	B10.M	f	:80	:80	:80
	A.CA	f	:80	:80	:80
	B10.Q	q	:60	:100	:80
	DBA/1	q	:60	:80	:60
	B10.P	p	:60	:80	:80
	C3H.NB	p	:80	:80	:80
	B10.BR	k	-	-	-
	B10.S	s	-	-	-
	A.SW	s	-	-	-
MLR Blasten	B10.D2	d	:100	:100	:100
	B10.Q	q	:100	:100	:100
Milzzellen	A.CA	f	:100	:100	:100
LPS Blasten	A.CA	f	-	-	-
	B10.D2	d	-	-	-
B-Zellen	A.CA	f	-	-	-
	A.SW	s	-	-	-
Thymozyten	A.CA	f	-	-	-
Erythrozyten	A.CA	f	:60	:60	:60

an T-Zellen und Erythrozyten läßt vermuten, daß die Antigene sich passiv aus Serum und Plasma an diese Zellen binden. Bei Menschen wurde dieses Phänomen für die Blutgruppenantigenen Chido- und Rodgers (81) und in der Maus für die H-2.7 Determinante, die von der S Region codiert wird (45, 48) beschrieben. Um dieses genau zu untersuchen, wurden Inhibitionsexperimente der monoklonale Antikörper mit Serum und Plasma von verschiedenen Mäusen durchgeführt. Die Antikörper wurden mit Serum und Plasma in verschiedenen Verdünnungen vorinkubiert und dann auf die Fähigkeit zu agglutinieren getestet. Wie Tabelle 19 zeigt, wird die Eigenschaft zu agglutinieren von allen drei Antikörpern nach Inkubation mit A.CA Serum und Plasma bis zu einer Verdünnung von 1:40 inhibiert. Vorinkubation mit C57BL/10Sn (= B10) Serum und Plasma blockt nur 112/10-19. Dieses Ergebnis entspricht dem im direkten Test, in welchem 112/10-19 positiv mit Zellen von B10 reagiert. Ähnliche Ergebnisse wurden mit T-Zellen im Radioimmunoassay erhalten (Abb. 8). A.CA und B10.D2 Serum inhibiert alle drei Antikörper (B10.BR Serum nur 112/38-12). Weitere Inhibierungsversuche wurden mit Human-, Meerschweinchen- und Fötalem Kälber-Serum unternommen. Die beiden letzteren blockieren die drei Antikörper nicht, während Human-Serum die Bindung von 112/39-2 und 112/15-16 im Radioimmunoassay an T-Zellen blockieren kann (Abb. 9). Vorinkubationen mit 10-fach konzentriertem ConA- und Makrophagenkultur-Überstand führte ebenfalls zur Inhibition der Bindung der drei monoklonalen Antikörper an T-Zellen (Abb. 10).
Diese Ergebnisse kann man so interpretieren, daß die Determinanten, die von den drei Antikörpern entdeckt werden, im Serum und Plasma der Mäuse vorhanden sind, an dessen Erythrozyten und T-Zellen sich die Antikörper binden.

Tabelle 19. Inhibition der PVP-Hämagglutinationsaktivität der monoklonalen Antikörper 112/10-19, 112/15-16 und 112/39-2 mit Serum und Plasma von A.CA, CBA und B10 Mäusen

Inhibition	Verdünnung	Test an	Antikörperaktivität 112/10-19	112/15-16	112/39-2
A.CA Serum	:10	A.CA	-----[a]	-----	-----
	:20		-----	-----	-----
	:40		[b]1----	11---	111--
	:80		111--	11---	1-1--
A.CA Plasma	:10	A.CA	-----	-----	-----
	:20		-----	-----	-----
	:40		111--	11---	11---
	:80		11111	-11--	1111-
CBA Serum	unverdünnt	A.CA	[c]4444-	4444-	4433-
	:2		4444-	4433-	4444-
	:4		3344-	3444-	3444-
	:8		4432-	4444-	4444-
CBA Plasma	unverdünnt	A.CA	4443-	4444-	4444-
	:2		4444-	4444-	4444-
	:4		3344-	3444-	3444-
	:8		4432-	4444-	4444-
B10 Serum	:10	A.CA	-----	4444-	3444-
	:20		-1---	3444-	4444-
	:40		11---	4444-	3344-
	:80		1-1--	4444-	4433-

Tabelle 19. Fortsetzung

[a]Kontrolle mit PVP-BSA-PBS Lösung

[b]Die erste Zahl gibt die Stärke der Agglutination in einer Verdünnung des Antikörpers von 1:10 an. Die weiteren Verdünnungen sind entsprechend 1:20, 1:40 und 1:80.

[c]Die Zahlen 1-4 geben die Stärke der Agglutination an.

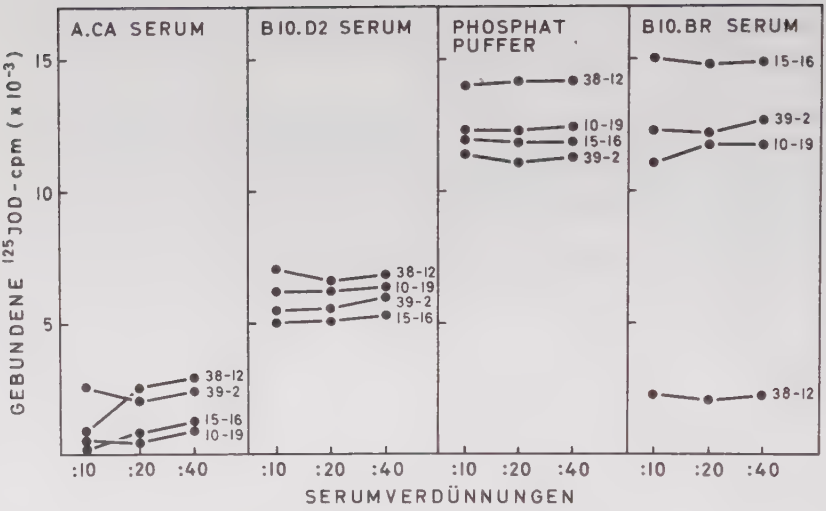


Abbildung 8. 50 µl Gewebekulturüberstand der monoklonalen Antikörper 112/10-19, 112/15-16, 112/39-2 und 112/38-12 wurden mit 50 µl Serum von den Mäusen A.CA, B10.D2, B10.BR und als Kontrolle mit Phosphatpuffer inkubiert und anschließend in verschiedenen Verdünnungen im Radioimmunoassay gegen A.CA T-Lymphozyten auf verbleibende Aktivität getestet.

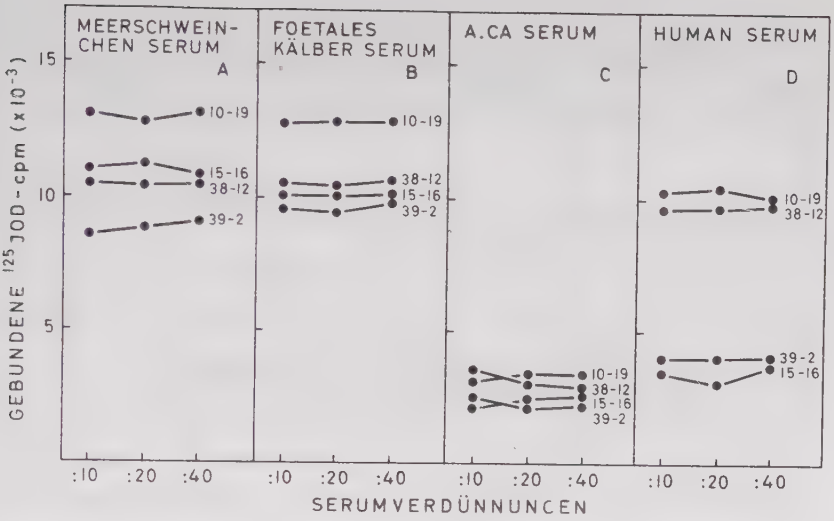


Abbildung 9. 50 µl Gewebekulturüberstand der monoklonalen Antikörper 112/10-19, 112/15-16, 112/39-2 und 112/38-12 wurden mit 50 µl Meerschweinchenserum, Foetalem Kälberserum, A.CA Serum und Humanem Serum inkubiert und anschließend in verschiedenen Verdünnungen im Radioimmunoassay gegen A.CA T-Lymphozyten auf verbleibende Aktivität getestet.

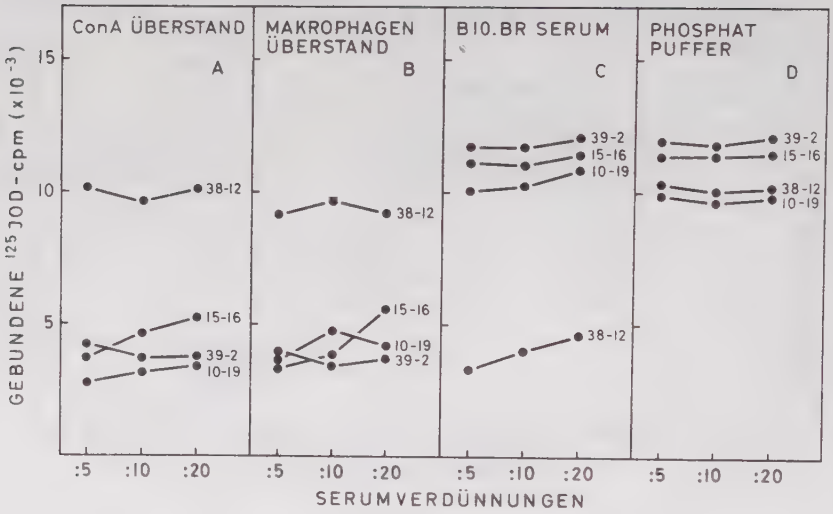


Abbildung 10. 50 µl Gewebekulturüberstand der monoklonalen Antikörper 112/10-19, 112/15-16, 112/39-2 und 112/38-12 wurden mit 50 µl Medium von Con A Kulturen, Medium von Makrophagenkulturen, B10.BR Serum und Phosphatpuffer inkubiert und anschließend in verschiedenen Verdünnungen im Radioimmunoassay gegen A.CA T-Lymphozyten auf verbleibende Aktivität getestet.

Es wird vermutet, daß Makrophagen Komplement-Komponenten synthetisieren und sezernieren und folglich können Gewebekulturüberstände von Makrophagen- und Con A-Kulturen (enthalten ebenfalls Makrophagen) alle drei Antikörper inhibieren.

3.4.5. De- und Readsorption der Determinanten von Zellen

Die Hypothese des Passiv-Bindens der Antigene wird durch die Resultate in Tabelle 20 und 21 weiter unterstützt. In Tabelle 20 wurden $\underline{H\text{-}2^f}$ Erythrozyten mit und ohne normales Mäuseserum in einem Puffer mit geringer Ionenstärke (10% Sucrose) über Nacht inkubiert, gewaschen und mit den drei monoklonalen Antikörpern getestet. Erythrozyten, die ohne oder mit Serum von $\underline{Ss^1}$ Stämmen (CBA oder B10.BR) inkubiert worden waren, banden nicht mehr die Antikörper, obwohl sie weiterhin das klassische H-2.9 Antigen besaßen, wie die Agglutination durch das Alloantiserum K309 (anti H-2.9) bewies.
Erythrozyten, die mit Serum von B10 Mäusen inkubiert worden waren, konnten nicht mehr mit 112/15-16, 112/39-2 agglutiniert werden, die Reaktion mit 112/10-19 blieb unbeeinflußt. Die Reaktion mit Erythrozyten, die mit B10.P ($\underline{H\text{-}2^p}$) Serum inkubiert wurden, blieb ebenfalls unbeeinflußt. Ähnliche Ergebnisse wurden mit T-Zellen anstelle von Erythrozyten erhalten.
Alle diese Daten weisen darauf hin, daß die von den monoklonalen Antikörpern entdeckten Antigene in einem Puffer mit geringer Ionenstärke und in Serum, das das Antigen nicht enthält, von der Membran gelöst werden können. Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse von Agglutinationsexperimenten der drei monoklonalen

Tabelle 20. "Shedding von C4b Molekülen von Erythrozyten unter "Low Jonic Strength" Bedingungen

Erythrozyten[a]	Mausserum	Hämagglutinationsaktivität von			
		112/10-19	112/15-16	112/39-2	K3o9[b]
A.CA	A.CA	[c]4444-[d]	4444-	4433-	4444-
A.CA	-	-----	-----	-----	4444-
A.CA	CBA	-----	-----	-----	4444-
B10.M	B10.M	4444-	4444-	4443-	4444-
B10.M	-	-----	-----	-----	-----
B10.M	B10.BR	-----	-----	-----	-----
B10.M	B10	4444-	-----	-----	4444-

[a]Erythrozyten von A.CA und B10.M Mäusen (H-2[f]) wurden über Nacht in einer 10% Sucroselösung mit oder ohne Mausserum inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und im PVP-Hämagglutinationstest auf die Anwesenheit der passiv gebundenen Moleküle untersucht (s. Mat. u. Meth.).

[b]Das Alloantiserum K3o9 hat die Spezifität H-2.9.

[c]Die erste Zahl gibt die Stärke der Agglutination in der ersten serialen Verdünnung, Start 1:10, an.

[d]Kontrolle enthältPVP-BSA-PBS Lösung.

Tabelle 21. Readsorption von C4b an "nackte" Erythrozyten

Erythrozyten "nackt"[d]	Mausserum	Hämagglutinationsaktivität von			
		112/10-19	112/15-16	112/39-2	K309[a]
A.CA	-	[b]-----[c]	-----	-----	4444-
A.CA	A.CA	4432-	4444-	4432-	4444-
A.CA	B10.D2	4422-	4442-	3433-	4442-
A.CA	B10.BR	-----	-----	-----	4444-
A.CA	B10	3433-	-----	-----	4444-

[a]K309 ist ein Alloantiserum mit der Spezifität H-2.9.

[b]Die erste Nummer gibt die Stärke der Agglutinierung in der ersten serialen Verdünnung, Start 1:10, an.

[c]Kontrolle enthält PVP-BSA-PBS Lösung.

[d]A.CA Erythrozyten, die durch Inkubation in einer 10% Sucroselösung die passiv gebundenen C4b Molekülen verloren hatten, wurden ein zweites Mal über Nacht in einer 10% Sucroselösung in Anwesenheit verschiedener Mausseren inkubiert.
Im anschließenden PVP-Hämagglutinationstest wurde untersucht, ob die C4b Moleküle aus dem Serum wieder passiv an die Zellen gebunden wurden (s. Material und Methoden).

Antikörper mit A.CA Erythrozyten, die über Nacht mit 10% Sucrose inkubiert worden waren. Die "nackten" Zellen wurden mit den Antikörper und dem Alloantiserum anti-H-2.9 getestet, dann mit oder ohne Serum vorinkubiert und auf ihre Agglutinierbarkeit untersucht. Die Erythrozyten erhielten ihre Bindungsfähigkeit zurück, wenn sie mit A.CA oder B10.D2 Serum vorinkubiert wurden, blieben jedoch negativ nach Inkubation mit Ss[1] B10.BR Serum. Nach Inkubation von A.CA Zellen mit B10.Serum reagierten sie mit 112/10-19 positiv, jedoch negativ mit den anderen beiden Antikörpern. Die Behandlung der Zellen durch Puffer mit geringer Ionenstärke beeinflußte nicht die Aktivität des H-2.9 spezifischen Antikörpers, was beweist, daß die Zellen intakt geblieben sind.
Aus diesen Daten kann man schließen, daß Erythrozyten, die in Puffer mit geringer Ionenstärke passiv gebundene Antigene verlieren, diese durch Inkubation mit positivem Serum in demselben Puffer zurück erhalten können.

3.4.6. Beziehung zwischen den Antigenen im Serum und den Ss-Molekülen

Um die Verbindung zwischen den die Determinanten tragenden Molekülen und den Ss Proteinen zu zeigen, wurden folgende Experiemente durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle 22 zusammengefaßt sind. Plasma und Serum von A.CA Mäusen wird mit Kaninchen anti-Ss Serum über Nacht inkubiert, das Präzipität zentrifugiert und im Ouchterlony Immundiffusionstest auf restliches Ss-Protein getestet. Das von Ss-Molekülen befreite Serum und Plasma wird anschließend im PVP-Test zur Inhibition der drei monoklonalen Antikörper verwendet. Ss-freies Serum und Ss-freies Plasma waren nicht in der Lage,

Tabelle 22. PVP-Hämagglutinationsaktivität der monoklonalen Antikörper 112/10-19, 112/15-16 und 112/39-2 nach Inkubation mit anti Ss behandeltem Serum und Plasma

Zugabe von	Verdünnung	Getestet an	Hämagglutinationsaktivität von 112/10-19	112/15-16	112/39-2
A.CA Serum	:10	A.CA	[a]4 4 4 4 -[b]	4 4 4 4 -	4 4 4 4 -
ohne Ss	:20		4 4 4 4 -	4 4 4 4 -	4 4 3 4 -
	:40		4 4 4 3 -	3 4 4 4 -	4 4 4 4 -
	:80		4 4 4 4 -	4 4 4 4 -	4 4 4 3 -
A.CA Plasma	:10	A.CA	4 4 4 4 -	4 4 4 4 -	4 4 4 4 -
ohne Ss	:20		4 4 4 3 -	4 4 4 3 -	4 4 4 2 -
	:40		4 4 4 4 -	4 4 4 4 -	4 4 4 4 -
	:80		4 4 4 3 -	4 4 4 4 -	4 4 4 4 -
A.CA Serum	:10	A.CA	- - - - -	- - - - -	- - - - -
CBA Serum	unverdünnt	A.CA	4 4 4 4 -	4 4 4 4 -	4 4 4 4 -

[a]Die erste Nummer gibt die Stärke der Agglutinierung in der ersten serialen Verdünnung, Start 1:10, an. Die weiteren Verdünnungen sind entsprechend 1:20, 1:40 und 1:80. Die Zahl -4- symbolisiert die stärkste Agglutination der Erythrozyten, - bedeutet negative Reaktion.

[b]Kontrolle mit PVP-PBS-BSA Lösung.

einen der drei Antikörper in der Agglutination der A.CA Erythrozyten zu inhibieren.

3.4.7. Inhibition mit C4b und C4 Bindungsprotein

Über Sephadex G 200 Säulen gereinigtes C4b und C4 Bindungsprotein (89, 90) wurde für 30 min mit den drei monoklonalen Antikörper in jeweils verschiedenen Verdünnungen bei RT inkubiert. Anschließend wurde ein PVP-Test gegen A.CA Erythrozyten durchgeführt, der zeigen sollte, ob die Antikörper die Zellen noch agglutinieren können, oder ob sie durch die Komplement-Komponenten blockiert werden. Tabelle 23 zeigt, daß C4b die Antikörper inhibieren kann, während gereinigtes C4 Bindungsprotein keinen Enfluß auf die Agglutination hat. Dieses Ergebnis ist ein wichtiger Hinweis dafür, daß sich die Antigendeterminanten der drei Antikörper auf einer Komplement-Komponente befinden und von der S-Region im H-2 Komplex codiert werden.

Tabelle 23. Inhibition der monoklonalen Antikörper 112/10-19, 112/15-16 und 112/39-2 mit gereinigtem C4b und C4 Bindungsprotein

Inhibition mit	Verdünnung	Getestet an	Hämagglutinationsaktivität von 112/10-19	112/15-16	112/39-2
C4b	:10	A.CA	[a]- - - - -[b]	- - - - -	- - - - -
	:20		1 1 - - -	1 - - - -	- - - - -
	:40		- - - - -	- - 1 - -	- - - 1 1
	:80		- - - - -	- - - - -	- - - - -
C4 Bp	:10	A.CA	3 3 4 4 -	4 4 4 4 -	4 4 4 4 -
	:20		4 4 3 3 -	4 4 4 4 -	4 4 4 4 -
	:40		4 4 3 3 -	3 4 4 3 -	4 4 4 3 -
	:80		4 4 4 4 -	4 3 3 3 -	3 3 3 3 -
A.CA Serum	:10	A.CA	- - - - -	- - - - -	- - - - -
CBA Serum	unverdünnt	A.CA	4 4 4 4 -	4 4 4 4 -	4 4 4 4 -

[a]Die erste Nummer gibt die Stärke der Agglutinierung in der ersten serialen Verdünnung, Start 1:10, an. Die weiteren Verdünnungen sind entsprechend 1:20, 1:40 und 1:80. Die Zahl -4- symbolisiert die stärkste Agglutination der Erythrozyten, - bedeutet negative Reaktion.

[b]Kontrolle enthält PVP-PBS-BSA Lösung.

3.5. S Region: C4 Bindungsprotein

Der monoklonale Antikörper 112/38-12 wurde durch Immunisierung von A.SW Mäusen mit A.CA Con A Blasten und anschließender Hybridisierung mit P-3 Myelomzellen hergestellt. Die Zellinie sezerniert einen spezifischen Antikörper der IgG1, κ, Klasse und alle Untersuchungen wurden im PVP-Hämagglutinationstest durchgeführt.

3.5.1. Reaktivität mit Inzucht- und kongenen Mäuselinien

Die Typisierung von Inzucht- und B10.W Mäuselinien führte zu dem Ergebnis, daß der monoklonale Antikörper 112/38-12 eine Determinante entdeckt, die von einem Gen kontrolliert wird, das zwar anscheinend nicht im H-2 Komplex liegt, aber eng an diesen gekoppelt ist. Diese Ergebnis wurde erwartet, denn die Mäuse A.CA und A.SW unterscheiden sich nur für Gene auf dem 17. Chromosom.

In allen Fällen, in denen Inzuchtmäuse einen identischen H-2 Haplotyp, aber einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund hatten (B10, A.BY; B10.P, C3H.NB; usw.) war die Reaktivität des Antikörpers mit dem H-2 Haplotyp assoziert (Tabelle 24).

Tabelle 24 zeigt, daß Zellen einiger unabhängig entstandenen B10.W Linien mit serologisch nicht zu unterscheidendem H-2 Haplotypen (die Linien STC77 und CHR51, BUA1, BUA16 und BUA19, SNA72, DRB62 und WOA105, STA10, STA12 und LIB55, siehe Ref. 34, 35) mit dem Antikörper identisch reagierten.

Die Ergebnisse in Tabelle 24 und 25 lassen den Schluß zu, daß der monoklonale Antikörper sich an eine Determinante bindet, die von einem Gen codiert wird, welches H-2 gekoppelt ist. Das nähere Kartieren des Locus wurde dadurch erschwert, daß

Tabelle 24. Reaktivität des monoklonalen Antikörpers 112/38-12 im PVP-Hämagglutinationstest und Radioimmunoassay mit Erythrozyten und T-Zellen von unabhängigen und rekombinanten Inzuchtmäuselinien

Mauslinie	H-2 Regionen							Titer des Antikörpers 112/38-12	
	K	I-A	I-J	I-E	S	C4Bp	D	RIA[a]	PVP[b]
B10, A.BY	b	b	b	b	b	b	b	-	-
B10.D2, BALB/c	d	d	d	d	d	d	d	:60	:80
B10.M, A.CA	f	f	f	f	f	f	f	:80	:80
B10.WB	j	j	j	j	j	j	b	:60	:80
B10.Q, DBA1	q	q	q	q	q	q	q	:80	:80
B10.P, C3H.NB	p	p	p	p	p	p	p	:60	:80
B10.BR, CBA	k	k	k	k	k	k	k	-	-
B10.S, A.SW	s	s	s	s	s	s	s	-	-
B10.PL	u	u	u	u	u	u	u	-	-
B10.SM	v	v	v	v	v	v	v	:60	:80
B10.RIII	r	r	r	r	r	r	r	:60	:80
C3H.OH	d	d	d	d	d	d	k	:60	:80
C3H.OL	d	d	d	d	k	k	k	-	-
B10.A	k	k	k	k	d	d	d	:80	:80
A	k	k	k	k	d	d	d	:80	:80
A.AL	k	k	k	k	k	k	d	-	-
B10.S(8R)	k	k	k	.	s	s	s	-	-
B10.S(9R)	s	s	s	k	d	d	d	:80	:80
B10.HTT	s	s	s	k	k	k	d	-	-
A.TFR1	s	k	k	k	k	k	f	-	-
B10.M(11R)	f	f	f	f	f	d	d	:60	:80
B10.M(17R)	k	k	k	k	d	d/f	f	:80	:80
B10.P(13R)	p	p	p	p	b	b	b	-	-

Tabelle 24. Fortsetzung.

B10.GD	d	d	d	b	b	b	b	-	-
B10.A(3R)	b	b	b	k	d	d	d	:60	:
B10.A(5R)	b	b	b	k	d	d	d	:60	:
A.TH	s	s	s	s	s	d	d	:60	:
A.BTR1	b	b	b	b	b	d	d	:60	:

[a]Radioimmunoassay.

[b]PVP-Hämagglutinationstest.

Tabelle 25. Reaktivität des monoklonalen Antikörpers 112/28-12 im PVP-Hämagglutinationstest mit Erythrozyten von B10.W Mäuselinien

Mauslinie	H-2 Regionen				Titer des Antikörpers
	K	I	S	D	112/38-12
SNA70	k	k	w8	w8*	-
KPA44	d	.	.	w9	:40
STC90	w15	.	.	w15	:40
CAS1	w23	.	.	w23	:40
CHA2	q	k	k	w26	-
SAA48	w3	.	.	w3	-
CAA2	f	p	.	w11	:40
STA62	w27	w27	w27	w27	-
STC77	d	p	.	w18	:40
CHR51	d	p	.	w18	:40
BUA19	w16	w16	w16	k	:40
BUA16	w16	w16	w16	k	:40
BUA1	w16	w16	w16	k	:40
SNA57	v	v	w10	w10	:60
DRB62	v	v	w10	w10	:60
WOA105	v	v	w10	w10	:60
KPA42	v	v	w1	w1	-
STA10	w13	w13	.	w13	:40
STA12	w13	w13	.	w13	:40
LIB55	w13	w13	.	w13	:40
GAA20	w3	.	.	w4	-
KEA5	d	.	.	w5	:40
MOL1	k	.	.	w12	-
CAS2	w17	w17	.	w17	:40

Mausstämme, die das $\underline{Ss}^{l}$ Allel haben, im direkten Test mit dem Antikörper negativ waren, obwohl die Determinante im Serum vorhanden ist. Aus diesem Grund konnten Rekombinanten mit $\underline{H\text{-}2}^{k}$ Haplotypen in der S-Region für die Kartierung nicht verwendet werden (siehe unten).
Rekombinanten mit einem $\underline{Ss}^{h}$ Allel, deren Zellen von dem monoklonalen Antikörper agglutiniert werden, weisen jedoch darauf hin, daß die Determinante von einem Gen in oder nahe der S-D Region kodiert wird. Zellen von B10.S(9R), B10.A(3R) und (5R) reagieren positiv, während Zellen von B10.P(13R), B10.S(8R) und B10.HTT negativ reagieren.

	K	I	S	C4 Bp	D	Bindung
B10	b	b	b	b	b	-
C3H	k	k	k	k	k	-
DBA/2	d	d	d	d	d	+
B10.S	s	s	s	s	s	-
B10.S(8R)	k	k	s	s	s	-
B10.A(5R)	b	b	k	d	d	+
B10.S(9R)	s	k	d	d	d	+
B10.P(13R)	p	p	b	b	b	-
B10.HTT	s	s	k	d	d	-
A.BTR1	b	b	b	d	d	+
A.TH	s	s	s	d	d	+

Durch diese Typisierungen wurde die Spezifität in die S-Region kartiert; die Reaktion des Antikörpers mit Zellen von A.BTR1 und A.TH, die ebenfalls positiv reagieren, läßt diese Schlußfolgerung aber nicht zu. Diese Mäuse besitzen in der S-Region ein s und b Allel; der Antikörper reagiert jedoch nicht mit Zellen von Mäusen mit den Haplotypen $\underline{H\text{-}2}^{s}$ (A.SW) und $\underline{H\text{-}2}^{b}$ (A.BY).

Aus diesen Experimenten ist anzunehmen, daß die Antigendeterminante von einem Gen kodiert wird, das zwischen Ss und H-2D liegt.
Vergleicht man die Aktivität dieses Antikörpers gegen C4 Bp mit dem, der möglicherweise einen neuen H-2"X" Locus in der S-D Region definiert (Kap. 3.2), so läßt sich der C4 Bp Locus möglicherweise zwischen S und H-2"X" kartieren.

	K	I	S	C4 Bp	"X"	D	Bindung 102/40-7	Bindung 112/38-12
B10	b	b	b	b	b	b	-	-
C3H	k	k	k	k	k	k	-	-
DBA/2	d	d	d	d	d	d	-	+
A.CA	f	f	f	f	f	f	+	+
B10.P	p	p	p	p	p	p	+	+
B10.P(13R)	p	p	b	b	b	b	-	-
B10.M(11R)	f	f	f	f	f	d	+	+
B10.M(17R)	k	k	d	d/f	f	f	+	+
A.TFR1	k	k	k	k	f	f	+	-

112/38-12 bindet an Zellen des Haplotypes $H\text{-}2^d$, 102/40-7 dagegen nicht, beide reagieren jedoch positiv mit $H\text{-}2^f$ Zellen und mit Zellen der Rekombinante B10.M(11R). Gegen die Rekombinante A.TFR1 zeigen die monoklonalen Antikörper eine unterschiedliche Aktivität: 102/40-7 ist positiv, 112/38-12 negativ. Diese Rekombinante hat einschließlich der S-Region einen $H\text{-}2^k$ Haplotype, in H-2"X" und H-2D ein $H\text{-}2^f$ Allel. Dieses Ergebnis macht es relativ unwahrscheinlich, daß sich der C4 Bp Locus zwischen H-2"X" und H-2D befindet, es sei denn, das 112/38-12 negative $H\text{-}2^k$ Allel wäre durch ein Doppel Crossing-over Ereignis in diese Region gekommen.

3.5.2. Absorptionen

Mit Zellen der Inzuchtlinien, die im direkten Test negativ mit dem monoklonalen Antikörper reagierten, wurden Absorptionen durchgeführt.
Dazu wurden 50 µl Antikörper-Lösung mit 2 x 10^8 Zellen inkubiert und nach Abtrennung der Zellen, der Überstand anschließend im PVP-Test gegen A.CA Erythrozyten auf Antikörperrestaktivität untersucht. Tabelle 26 zeigt, daß alle im direkten Test negativen Zellen den Antikörper nicht absorbieren können.

3.5.3. Gewebeverteilung der Determinante

Die Gewebeverteilung der Determinante dieses Antikörpers ist identisch zu der von den C4b-Determinanten, die im vorherigen Kapitel beschrieben wurden.
Der Antikörper bindet sich an Con A- und MLR-Blasten, an Erythrozyten, jedoch nicht an B-Zellen, Thymozyten oder an LPS-stimulierte Lymphozyten (Tabelle 27).
Bei den Experimenten mit den Con A Blasten kam es im Antikörpertiter und in der Affinität zu ähnlichen Schwankungen wie in Testen gegen unstimulierten Zellen. Diese Schwierigkeit konnte zum großen Teil dadurch ausgeglichen werden, daß nur von jungen und gesunden Mäusen Zellen für die Experimente genommen wurden.

Tabelle 26. Quantitative Absorption des monoklonalen Antikörpers 112/38-12

Aborsorbiert von	Getestet an	Hämagglutinationsaktivität von 112/38-12
B10	A.CA	[b]3 3 4 2 -[c]
B10.BR	A.CA	3 4 3 3 -
B10.S	A.CA	3 4 2 3 -
B10.PL	A.CA	3 3 3 3 -
B10.SM	A.CA	[a]
A.CA	A.CA	- - - - -

[a]Nicht getestet.

[b]Erste Zahl gibt den Titer in der Verdünnung :10 an; weitere Verdünnung sind :20, :40, :80. Die Zahl - 4 - symbolisiert die stärkste Agglutination der Erythrozyten, - 1 - bedeutet eine schwache Reaktion, - ist negativ.

[c]Kontrolle mit PVP-PBS-BSA Lösung.

Tabelle 27. Reaktivität des monoklonalen Antikörpers 112/38-12 im Radioimmunoassay mit Zellen verschiedener Gewebe von unabhängigen Inzuchtmäuselinien

Gewebe	Mauslinie	H-2 Haplotyp	Titer des Antikörpers 112/38-12
Con A	B10	b	-
Blasten	B10.D2	d	:60
	BALB/c	d	:60
	B10.M	f	:60
	A.CA	f	:60
	B10.Q	q	:40
	DBA/1	q	:40
	B10.P	p	:40
	C3H.NB	p	:40
	B10.BR	k	-
	B10.S	s	-
	A.SW	s	-
MLR	B10.D2	d	:100
Blasten	B10.Q	q	
Milz	A.CA	f	:60
LPS	A.CA	f	-
Blasten	B10.D2	d	-
B-Zellen	A.CA	f	-
	A.SW	s	-

Tabelle 27. Fortsetzung

Thymo-zyten	A.CA	f	-
Erythro-zyten	A.CA	f	:60

Tabelle 28. Inhibition der PVP-Hämagglutinationsaktivität des monoklonalen Antikörpers 112/38-12 mit Serum und Plasma von A.CA, CBA und B10 Mäusen

Inhibition durch	Verdünnung	Test an	Aktivität des Antikörpers 112/38-12
A.CA Serum	:10	A.CA	[a] - - - - - [c]
	:20		- - - - -
	:40		- - - - -
	:80		1 1 - - -
A.CA Plasma		A.CA	
	:10		- - - - -
	:20		- - - - -
	:40		1 1 - - -
	:80		1 1 - - -
CBA Serum		A.CA	
	unverdünnt		[b] 4 4 3 3 -
	:2		4 4 4 4 -
	:4		4 4 4 3 -
	:8		4 4 4 4 -
CBA Plasma		A.CA	
	unverdünnt		4 4 4 4 -
	:2		4 4 4 4 -
	:4		3 4 4 4 -
	:8		4 4 4 4 -
B10 Serum		A.CA	
	:10		3 4 4 4 -
	:20		4 4 4 4 -
	:40		3 3 4 4 -
	:80		4 4 3 3 -

Tabelle 28. Fortsetzung

[a]Erste Verdünnung des Antiserums ist 1:10, weitere Verdünnungen sind entsprechend 1:20, 1:40, 1:80.

[b]Die Zahlen geben die Stärke der Agglutination an.

[c]Kontrolle mit PVP-PBS-BSA Lösung.

3.5.4. Präsenz der Determinante in Serum und Plasma

Die Kartierung des Locus für diese Determinante in oder um die S-D Region des H-2 Komplexes läßt die Vermutung zu, daß der monoklonale Antikörper, ebenso wie im Falle der C4b positiven Antikörper, an ein C4 oder C4-assoziertes Molekül bindet, das sich passiv an Zellen bindet und im Serum und Plasma vorhanden ist. Um dises zu untersuchen, wurden mehrere Inhibitionsexperimente mit dem Antikörper durchgeführt.

Wie in Tabelle 28 zu sehen ist, konnte Serum von A.CA Mäusen den Antikörper bis zu einer Verdünnung von 1:40 inhibieren, ebenso wie A.CA- und CBA-Plasma. Dies weist darauf hin, daß es sich nicht um eine von der S-Region codierte C4-Determinante handeln kann, die den Antikörper blockiert, da CBA Mäuse das Ss^l-Allel besitzen.

Obwohl mehr CBA Serum und Plasma als von A.CA Mäusen zur Inhibition gebraucht wurde, handelt es sich um einen spezifischen Effekt, denn CBA Mäuse haben eine 20-fach geringere Konzentration an Ss-Molekülen als Mäuse, die das Ss^h-Allel besitzen (z.B. A.CA). Ähnliche Ergebnisse wurden im Test gegen T-Zellen im Radioimmunoassay erhalten (Abb. 8). Neben A.CA und B10.D2 Serum wird der Antikörper auch von B10.BR Serum inhibiert.

Weitere Blockierungsversuche mit Human-, Meerschweinchen- und fötalem Kälber-Serum und mit Con A- und Makrophagenkulturüberstand fielen negativ aus (Abb. 9 und 10).

3.5.5. De- und Readsorption der Determinanten von Erythrozyten

Passiv gebundene Antigene lassen sich von der Zelloberfläche lösen, wenn die Zellen für längere Zeit in einem Puffer mit geringer Jonenstärke (10% Sucrose in H_2O) inkubiert werden.

Tabelle 29. "Shedding" von C4 Bp Molekülen von Erythrozyten unter "Low ionic strength"-Bedingungen

Erythrozyten[d]	Mausserum	Hämagglutinationsaktivität	
		112/38-12	K309[a]
A.CA	A.CA	[b]4 3 3 2 -[c]	4 4 4 4 -
A.CA	-	- - - - -	4 4 3 4 -
A.CA	CBA	- - - - -	4 3 4 4 -
B10.M	B10.M	4 3 3 3 -	4 4 4 4 -
B10.M	-	- - - - -	4 4 4 4 -
B10.M	B10.BR	- - - - -	4 4 4 4 -
B10.M	B10	- - - - -	4 4 4 4 -

[a]K309 ist ein Alloantiserum mit der Spezifität H-2.9.

[b]Die erste Nummer gibt die Stärke der Agglutinierung in der ersten serialen Verdünnung, Start 1:10, an.

[c]Kontrolle enthält PVP-BSA-PBS Lösung.

[d]Erythrozyten von A.CA und B10.M Mäusen ($\underline{H\text{-}2^p}$) wurden über Nacht in einer 10% Sucroselösung mit oder ohne Mausserum inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und im PVP-Hämagglutinationstest auf die Anwesenheit der passiv gebundenen Moleküle untersucht (s. Material und Methoden).

Tabelle 30. Readsorption von C4 Bp an "nackte" Erythrozyten

Erythrozyten[d] "nackt"	Mausserum	Hämagglutinationsaktivität von 112/38-12	K309[a]
A.CA	-	[b] - - - - -[c]	4 4 4 4 -
A.CA	A.CA	4 4 4 2 -	4 4 4 3 -
A.CA	B10.D2	4 4 3 3 -	4 4 4 2 -
A.CA	B10.BR	- - - - -	4 4 4 3 -
A.CA	B10	- - - - -	4 4 4 4 -

[a] K309 ist ein Alloantiserum mit der Spezifität H-2.9.

[b] Die erste Nummer gibt die Stärke der Agglutinierung in der ersten serialen Verdünnung, Start 1:10, an.

[c] Kontrolle enthält PVP-BSA-PBS Lösung.

[d] A.CA Erythrozyten, die durch Inkubation in einer 10% Sucroselösung die passiv gebundenen C4 Bp Moleküle verloren hatten, wurden ein zweites Mal über Nacht in einer 10% Sucroselösung in Anwesenheit verschiedener Mausseren inkubiert. Im anschließenden PVP-Hämagglutinationstest wurde untersucht, ob die C4 Bp Moleküle aus dem Serum wieder passiv an die Zellen gebunden wurden (s. Material und Methoden).

Tabelle 29 zeigt, daß $\underline{H\text{-}2^f}$ Erythrozyten den monoklonalen Antikörper 112/38-12 nach der Sucroseinkubation nicht mehr binden können, mit oder ohne $\underline{Ss^1}$ Serum von CBA- oder B10.BR-Mäusen. Die Kontrolle mit einem anti H-2.9 Alloantiserum zeigt, daß sich unter den Testbedingungen die in der Membran integrierten Antigene nicht gelöst hatten und damit die Zelle intakt geblieben war. Dieses und das nächste Experiment unterstützen die Theorie, daß die Determinante, die der Antikörper erkennt, sich passiv an Zellen bindet. "Nackte", d.h., in 10% Sucrose inkubierte und gewaschene Erythrozyten, wurden mit verschiedenen Mausseren inkubiert und anschließend mit dem Antiserum daraufhin untersucht, ob die "nackten" Zellen das Antigen aus dem Serum zurückerhalten haben. Tabelle 30 zeigt, daß die Zellen von dem Antikörper nur agglutiniert werden können, wenn sie vorher mit Serum inkubiert worden waren, das diese Determinante enthält (A.CA und B10.D2).

3.5.6. Beziehung zwischen der Determinante und Ss-Molekülen

Um herauszufinden, ob das Antigen, an das sich der Antikörper bindet, auf Ss- oder Ss-assoziierten Molekülen liegt, wurde Plasma und Serum von A.CA Mäusen mit Kaninchen anti-Maus Ss-Protein vorgereinigt und anschließend für Inhibitionsexperimente verwendet. Tabelle 31 zeigt, daß Ss-freies Serum die Agglutination von Erythrozyten durch den Antikörper inhibieren kann, Ss-freies Plasma jedoch nicht. Das bedeutet, daß auch nach Entfernen von Ss-Molekülen aus Plasma die Determinante noch vorhanden ist, und daß diese in Serum mit C4-Molekülen assoziert sein muß, da sie mit Kaninchen anti-Maus Ss-Serum entfernt werden kann. C4 wird im Serum im Gegensatz zu Plasma

Tabelle 31. PVP-Hämagglutinationsaktivität des monoklonalen Antikörpers 112/38-12 nach Inkubation mit anti Ss behandeltem Serum und Plasma

Zugabe von	Verdünnung	Getestet an	Hämagglutinationsaktivität von 112/38-12
A.CA Serum	:10	A.CA	[a]4 4 4 4 -[b]
ohne Ss	:20		4 4 4 3 -
	:40		4 4 4 4 -
	:80		4 4 4 4 -
A.CA Plasma	:10	A.CA	- - 1 1 -
ohne Ss	:20		- - - - -
	:40		- - 1 1 -
	:80		- - - - -
A.CA Serum	:10	A.CA	- - - - -
CBA Serum	unverdünnt	A.CA	- - - - -

[a]Die erste Nummer gibt die Stärke der Agglutinierung in der ersten serialen Verdünnung, Start 1:10, an.
Die weiteren Verdünnungen sind entsprechend 1:20, 1:40 und 1:80. Die Zahl - 4 - symbolisiert die stärkste Agglutination der Erythrozyten, - bedeutet negative Reaktion.

[b]Kontrolle mit PVP-PBS-BSA Lösung.

Tabelle 32. Inhibition der PVP-Hämagglutination des monoklonalen Antikörpers 112/38-12 mit C4 Bp freiem Plasma

Inhibition durch	Verdünnung	Test an	Hämagglutinationsaktivität von 112/38-12
C4 Bp	:10	A.CA	[a]4 4 4 4 -[b]
freies	:20		3 4 4 3 -
A.CA	:40		4 4 4 2 -
Plasma	:80		4 4 4 4 -
A.CA Plasma	:10	A.CA	- - - - -

[a]Die erste Nummer gibt die Stärke der Agglutinierung in der ersten serialen Verdünnung, Start 1:10, an. Die weiteren Verdünnungen sind entsprechend 1:20, 1:40 und 1:80. Die Zahl - 4 - symbolisiert die stärkste Agglutination der Erythrozyten, - bedeutet negative Reaktion.

[b]Kontrolle enthält PVP-PBS-BSA Lösung ohne Antiserum.

rasch aktiviert und zerfällt in C4a und C4b, wobei sich C4b mit dem C4 Bindungsprotein assoziiert. Dieses regulatorische Protein verbindet sich nur bei Aktivierung von C4 mit dem C4b Protein; das letztere kommt bei Ss^h und bei Ss^1-Mäusen in Serum und Plasma in gleicher Menge vor.
Wenn die Determinante des Antikörpers auf dem C4-Bindungsprotein liegt, so sollte es möglich sein, mit einem Kaninchen anti-Maus-C4-Bp Serum dieses Molekül aus dem Plasma zu präzipitieren und damit eine Inhibition zu unterbinden. Tabelle 32 zeigt das Ergebnis eines PVP-Tests gegen A.CA Erythrozyten nach Inkubation des Antikörpers mit C4-Bp-freiem Plasma. Gereinigtes Plasma kann den Antikörper nicht mehr blockieren.

3.5.7. Inhibition mit gereinigtem C4 Bindungsprotein

Über Sephadex-G200 Säulen gereinigtes C4 Bindungsprotein wurde für 20 min mit dem monoklonalen Antikörper inkubiert. Anschließend wurde ein PVP-Test gegen A.CA Erythrozyten durchgeführt, der zeigen sollte, ob der Antikörper die Zellen noch agglutinieren kann, oder ob er durch das C4 Bindungsprotein blockiert wird. Tabelle 33 zeigt, daß gereinigtes C4 Bp in der Lage ist, den Antikörper zu blockieren.
Zusammenfassend kann man sagen, daß der monoklonale Antikörper 112/38-12 sich an eine Determinante bindet, die auf einem C4 Bindungsprotein liegt, das nicht von der S Region codiert wird, sondern von einem an den H-2 Komplex, nahe der S-D Region, gekoppelten Locus.

3.5.8. Diskussion: S-Region

Die Immunisierung mit Con A stimulierten Blasten in einer allogenen Kombination ergab vier monoklonale Antikörper, die

Tabelle 33. Inhibition des monoklonalen Antikörpers 112/38-12 mit gereinigtem C4b und C4 Bindungsprotein

Inhibition mit	Verdünnung	Getestet an	Hämagglutinationsaktivität von 112/38-12
C4b	:10	A.CA	[a] 4 4 3 3 - [b]
	:20		4 4 4 4 -
	:40		4 4 3 3 -
	:80		4 4 4 3 -
C4 Bp	:10	A.CA	1 - - - -
	:20		- - - - -
	:40		- - - - -
	:80		1 - - 1 -
A.CA Serum	:10	A.CA	- - - - -
CBA Serum	unverdünnt	A.CA	- - - - -

[a] Die erste Nummer gibt die Stärke der Agglutinierung in der ersten serialen Verdünnung, Start 1:10, an. Die weiteren Verdünnungen sind entsprechend 1:20, 1:40 und 1:80. Die Zahl - 4 - symbolisiert die stärkste Agglutination der Erythrozyten, - bedeutet negative Reaktion.

[b] Kontrolle mit PVP-PBS-BSA Lösung.

spezifisch mit Komponenten des Komplementsystems reagieren. Drei der vier Antikörper binden an Determinanten von C4, einer an das C4-Bindungsprotein. Folgende Ergebnisse sprechen für diese Schlußfolgerung:

1.) Die Moleküle, an die sich die Antikörper 112/10-19, 112/-15-16 und 112/39-2 binden, können mit Kaninchen anti-Maus Ss-Serum aus Plasma und Serum präzipitiert werden, so daß die Antikörper in ihrer Aktivität nicht länger blockiert werden. Der Antikörper 112/38-12 wird durch gereinigtes C4-Bp inhibiert. Nach Entfernung dieser Moleküle aus Serum wird die Blockierung aufgehoben.

Da die ersten drei Antikörper nicht nur mit Komponenten im Plasma, sondern auch im Serum reagieren, in welchem native C4-Moleküle in C4a- und C4b-Fragmenten aufgespalten werden, und die Antikörper durch gereinigtes C4b blockiert werden können, kann man schließen, daß die Antikörper 112/10-19, 112/15-16 und 112/39-2 Determinanten auf der Komplementkomponente C4b entdecken. In dieser Hinsicht unterscheiden sich diese Antigene von der H-2.7 Determinante (ebenfalls eine allotypische Determinante), die jedoch erst nach Aktivierung von C4b zu C4c und C4d in Plasma nachzuweisen ist (45).

2.) Die Gene für die Determinanten, an die sich die Antikörper 112/10-19, 112/15-16 und 112/39-2 binden, können in die S Region des H-2 Komplexes lokalisiert werden, die die C4-Komponenten kodieren; der Locus für die Determinante, an die sich der Antikörper 112/38-12 bindet, liegt im H-2 Komplex and kann in der S-D Region lokalisiert werden, zwischen S und H-2"X".

3.) Alle vier Determinanten sind in Serum und Plasma vorhanden und werden von den Zellen passiv adsorbiert. Die Adsorption an Erythrozyten hat allotypische Blutgruppenunterschiede

zur Folge, die schon beim Menschen und in der Maus beschrieben wurden (45, 69).

Die Adsorption der für den Antikörper 112/38-12 spezifischen Determinante ist von der Adsorption eines C4-Fragmentes abhängig: In Ss-niedrigen Mäuselinien bindet der Antikörper sich nicht an Zellen, obwohl er mit Molekülen im Serum reagiert. Wahrscheinlich ist die Konzentration von C4 (Ss) im Serum nicht hoch genug, um eine Bindung von C4-Fragmenten an Erythrozyten und T-Zellen nachweisen zu können. Und wenn das C4-Molekül nicht bindet, erfolgt auch keine Adsorption des C4-Bindungsproteins.

Die monoklonalen Antikörper definieren einen neuen Polymorphismus der C4-Komponenten. Dieser ist nicht nur unterschiedlich zu dem von Ss und Slp, sondern korreliert auch nicht mit Variationen, die mit biochemischen Methoden beschrieben wurden (Tabelle 33).

Um die Kennzeichnung von C4 Allelen nach Caroll und Capra fortzusetzen, könnte man die Phänotypen, die die Antikörper 112/10-19, 112/15-16 und 112/39-2 erkennen, mit C4.3, C4.4 und C4.5 benennen und der Phänotyp, der durch den Antikörper 112/38-12 identifiziert wird, mit C4 Bp.1 bezeichnen. Wie man Tabelle 34 entnehmen kann, trägt offensichtlich jeder unabhängige H-2 Haplotyp ein unterschiedliches C4 Allel, definiert durch biochemische und serologische Untersuchungen.

Tabelle 34. Strukturelle und Quantitative Variationen der C4 Moleküle

H-2 Haplotyp	H-2.7	Ss	Slp	γ-Kette Varianten	β Kette	α Kette Ss	C4b 10-19	15-16	39-2	C4 Bp 38-12
b	-[a]	h[b]	o[c]	γ1[d]	.[e]	103 000 d[f]	+[g]	+	+	+
d	-	h	a	γ2	C4.1	.	+	+	+	+
f	+	h	o	γ1	.	103 000 d	+	+	+	+
j	+	h	a	γ1	.	.	+	+	+	+
k	+	l	o	γ1	c4.2	103 000 d	-	-	-	+
p	+	h	a	γ1	C4.1	.	+	+	+	+
q	-	h	o	γ2	.	.	+	+	+	+
r	-	h	?	γ2	.	.	-	+	+	+
s	+	h	a	γ1	C4.1	103 000 d	-	-	-	-
u	-	h	a	γ2	.	.	-	+	+	-
v	-	h	o		.	.	+	+	+	+
B10.WR7	-	h	a	.	.	93 000 d	.	.	.	.

[a] PVP Test mit anti H-2.7 Alloantiserum (45).

[b] Unterschiede in der Konzentration von Ss, h = hoch; l = niedrig.

Tabelle 34. Fortsetzung

[d]Varianten 1 und 2 haben unterschiedliche Isoelektrische Punkte, 7,4 und 6,9 (48).

[e]Peptide map Unterschiede (47).

[f]Unterschiede im Molekulargewicht (46).

[g]Serologische Unterschiede (diese Arbeit).

4. Zusammenfassende Besprechung

Der H-2 Komplex zeichnet sich durch eine starke serologische Komplexität und einen außergewöhnlichen Polymorphismus seiner Gene aus; gleichzeitig findet man bei Populationsuntersuchungen, daß trotz der Komplexität und der scheinbar unbegrenzten Zahl von Allelen identische Allele in geographisch weit auseinanderliegenden und seit Jahrhunderten getrennten Populationen auftreten. Hier liegt also ein Gen-Komplex vor, der eine außergewöhnliche Variabilität bei gleichzeitiger Stabilität seiner Allele aufweist.
Mindestens zwei Möglichkeiten sind denkbar, diese zunächst widersprüchlich erscheinende Kombination von Eigenschaften zu erklären: Entwederhandelt es sich tatsächlich, wie bisher angenommen, um jeweils ein Gen mit einer großen, aber endlich-begrenzten Zahl von Allelen, die durch laufende Mutation entstehen; identische Allele in getrennten Populationen könnten dann unabhängig entstandene, zufällige "Wiederholungen" darstellen.
Oder aber der bisher charakterisierte Phänotyp ist nicht der Ausdruck eines Gens mit überaus zahlreichen Allelen, sondern setzt sich aus Produkten mehrerer enggekoppelter Gene zusammen, die alle nur eine kleine Zahl von (stabilen) Allelen aufweisen.Die Vielfältigkeit des Phänotyps wäre dann durch die Kombination mehrerer eingeschränkt variabler Gene erreicht.
Die erste Möglichkeit kann nur durch ausgedehnte Populationsuntersuchungen getestet werden. Die zweite Möglichkeit zu prüfen erschien möglich, nachdem eindeutig definierbare Reagenzien hergestellt werden konnten, monoklonale Antikörper, und eine große Zahl unabhängiger H-2 Haplotypen

in Form von B10.W Linien verfügbar geworden waren. Unter Einsatz dieser Mittel wurden Ergebnisse erhalten, die hier nochmals kurz zusammengefaßt folgende sind:

1. In der H-2K Region konnte rechts neben H-2K, zwischen H-2K und I-A, ein zusätzlicher Locus, H-2P, charakterisiert werden, der Eigenschaften eines Klasse I Locus aufweist, da sein Produkt eine ubiquitäre Gewebsverteilung und ein Molekulargewicht von 45000 Dalton aufweist. Der neue Locus wird durch das H-2 Rekombinantenpaar B10.KEA5 bzw. B10.STC77 (beide 47-21.13 positiv) und B10.CHR51 (47-21.13 negativ) definiert. DerLocus besitzt mindestens zwei, aber wahrscheinlich mehrere Allele.

2. In der H-2D Region konnte ein zusätzlicher Locus, vorläufig als H-2X bezeichnet, charaterisiert werden, der ebenfalls Eigenschaften eines Klasse Locus aufweist und dessen Produkt gemeinsame Strukturen mit einem Molekül in der K Region besitzt. Ohne weitere serologische und biochemische Untersuchungen, die den Rahmen dieser Arbeit bei weitem übersteigen, kann die Frage nicht beantwortet werden, ob dieser Locus mit kürzlich beschriebenen anderen Loci in der D Region, H-2L, H-2M oder H-2R identisch ist, oder einen zusätzlichen Locus darstellt.

3. Monoklonale Antikörper bestätigen innerhalb der Inzucht- und B10. Linien die Existenz der durch Alloantiseren definierten privaten und publiken Determinanten, H-2.22 und Ia.13.

4. für das S Gen wurde eine Variabilität nachgewiesen, die ähnlich der von Klasse I und Klasse II Genen zu sein scheint. Alle untersuchten H-2 Haplotypen zeigen untereinander qualitative und quantitative Unterschiede in den Molekülen, die von der S Region ausgeprägt werden (Tabelle 34).

Das Ss-Molekül setzt sich aus drei Polypeptidketten zusammen und zerfällt nach Aktivierung in die funktionellen Komponenten C4a, C4b, C4c und C4d. Es ist noch nicht eindeutig geklärt, wieviele Gene C4-Moleküle ausprägen, jedoch scheinen es zumindest zwei zu sein (S und Slp).

5. In der S-D Region des H-2 Komplexes, möglicherweise zwischen S und H-2X, konnte ein weiterer Locus charaterisiert werden, der die Ausprägung eines C4 Bindungsproteins (C4 Bp) kontrolliert. Dieses Molekül ist verantwortlich für die weitere Degradierung von C4b und bindet direkt an C4b oder wie dieses an Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Lymphozyten und Erythrozyten.

C4 Bp zeigt wie C4 strukturelle (serologische) Variationen innerhalb der getesteten Mäuse; es bestehen mindestens zwei Allele (+ und -).

Serologische Komplexität

Der Befund eines jeweils zusätzlichen Klasse I Locus in der K und D Region ist ein direkter Hinweis, daß die phänotypische Komplexität dieser Regionen tatsächlich durch mehrere enggekoppelte Gene bedingt sein könnte: So sind die Phänotypen H-2K^{p} und H-2K^{d} durch Antiseren definiert, die nicht nur Antikörper gegen das K-Molekül enthalten, sondern auch gegen das P-Molekül (H-2P^{p} bzw. H-2P^{d}). Werden Zellen unbekannter Mäuse mit diesen Reagenzien getestet, die nur das K^{d} bzw. K^{p} Allel besitzen, aber nicht gleichzeitig das P^{p} bzw. P^{d} Allel (oder umgekehrt), so erscheinen sie ein neues Allel zu besitzen, da sie die Aktivität des Antiserums nicht vollständig absorbieren können, d.h. diese Antiseren kreuzreagieren nur und zeige an, daß diese Allele publike Antigene gemeinsam haben.

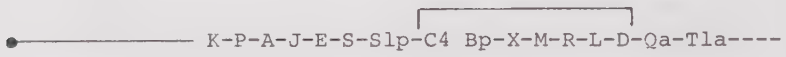
In Wirklichkeit besitzen sie ein gemeinsames identisches Allel, unterscheiden sich aber in dem Allel eines enggekoppelten Locus.
Der Nachweis multipler Gene in der H-2K und H-2D Region läßt die Frage aufkommen, wieviele Gene tatsächlich in diesen Regionen vorhanden sind.
Molekularbiologische Untersuchungen von Cami et al. (91) in Form von Southern Blot Analysis mit cDNS Proben, die die kodierende Sequenz für ein $H\text{-}2K^d$ Antigen vom C-terminalen Ende bis zur 3. Domaine des Moleküls enthält, gegen Leber DNS von BALB/c Mäusen zeigten mindestens 15 kreuzhybridisierende DNS Sequenzen. Diese Zahl scheint realistisch zu sein, denn zu den hybridisierenden Sequenzen kann man die Gene für die Tla, Qua1, Qua2, Qua3, K, P, X, L, M, D und R Produkte, also insgesamt schon elf, zählen.

Polymorphismus

Durch die Existenz multipler Loci und die Expression mehrerer K und D Moleküle wäre außerdem erklärt, wie es zu der erstaunlichen Stabilität von einigen Allelen, wie K^d, in unterschiedlichen Populationen der Welt kommt: Durch die Expression mehrerer Genprodukte mit normaler Allelfrequenz in der K und D Region entfällt die Notwendigkeit für ein Gen zu einer extremen Variabilität, sprich Allelie.
Der extreme Polymorphismus der K und D Loci wäre demnach ein Artefakt, eine Pseudoallelie, die durch die Untersuchungen mit Alloantiseren verursacht wurde, und ist in Wirklichkeit das Ergebnis mehrerer enggekoppelter Loci.
Multiple Allelie und deren Produkte könnten so in einfacher

Weise die serologische Komplexität der K und D Moleküle und die der Alloantiseren erklären, denn wahrscheinlich verteilen sich die einzelnen Determinanten eines sogenannten Inzucht K^d oder D^d Moleküls auf mehrere sehr ähnliche Produkte der K und D Region und die Reaktivität des Alloantiserums ist gegen die Gesamtheit der Moleküle und damit Determinanten gerichtet.

Auf Grund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der anderer Arbeitsgruppen (53, 83, 84, 86, 87, 88) läßt sich eine erweiterte H-2 Karte aufstellen:



Genfolge nicht bekannt

Zusammengefaßt war es also möglich, mit Hilfe monoklonaler Antikörper und einer großen Zahl von unabhängig voneinander entstandenen Mauslinien mit unterschiedlichen H-2 Haplotypen Hinweise dafür zu erhalten, daß der H-2 Komplex multiple enggekoppelte Gene jeder Klasse beherbergt, die zumindest partiell eine phänotypisch komplexe Struktur ihrer Produkte verursachen und zu einer Vielfalt der Phänotypen beitragen. Es ist denkbar, daß dem phänotypisch unbegrenzt erscheinenden Polymorphismus ein eingeschränkter Polymorphismus mehrerer gleichartiger, enggekoppelter Gene zugrunde liegt (Pseudoallelie).

5. Literaturverzeichnis

1. Haldane, J.B.S.: The genetics of cancer. Nature 132: 265-267, 1933
2. Gorer, P.A.: The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. Brit. J. Exp. Pathol. 17: 42-50, 1936b
3. Gorer, P.A.: The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. J. Pathol. Bacteriol. 44: 491-697, 1937a
4. Snell, G.D.: Methods for the study of histocompatibility genes. J. Genetics 49: 87-108, 1948
5. Counce, S., Smith, P., Barth, R., und Snell, G.D.: Strong and weak histocompatibility gene differences in mice and their role in the rejection of homografts of tumors and skin. Ann. Surg. 144: 198-204, 1956
6. Klein, J.: Biology of the mouse histocompatibility-2 complex. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1975
7. Götze, D. (ed.): The major histocompatibility system in man and animals. Springer-Verlag, New York, 1977
8. Klein, J.: The major histocompatibility complex of the mouse. Science 203: 516-521, 1979
9. Vitetta, E.S. und Capra, J.D.: The protein products of the murine 17th chromosome: Genetics and structure. Adv. Immunol. 20: 147-193, 1978
10. Shreffler, D.C. und David, C.S.: The H-2 major histocompatibility complex and the I-immune response region: Genetic variation, function and organization. Adv. Immunol. 20: 125-195, 1975
11. Vitetta, E.S., Uhr, J.W., und Boyse, E.A.: Association of a β_2-microglobulin-like subunit with H-2 and TL alloantigens on murine thymocytes. J. Immunol. 114: 252-254,

1975

12. Vitetta, E.S., Polik, M.P., Klein, J. und Uhr, J.W.: β_2-microglobulin is selectively associated with H-2 and TL alloantigens on murine lymphoid cells. J. Exp. Med. 144: 179-192, 1976
13. Zinkernagel, R.M. und Doherty, D.C.: MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. Adv. Immunol. 27: 51-127, 1979
14. McDevitt, H.O. und Benacerraf, B.: Genetic control of specific immune responses. Adv. Immunol. 11: 31-74, 1969
15. Cullen, S.E., Freed, J.H. und Nathenson, S.G.: Structural and serological properties of murine Ia alloantigens. Transplant. Rev. 30: 236-270, 1976
16. David, C.S.: Serological and genetical aspects of murine Ia antigens. Transplant. Rev. 30: 299-230, 1976
17. McDevitt, H.O., Deak, B.D., Shreffler, D.C., Klein, J., Stimpfling, J. und Snell, G.D.: Genetic control of the immune response mapping of the Ir-1 locus. J. Exp. Med. 135: 1259-1278, 1972
18. David, C.S., Shreffler, D.C. und Frelinger, J.A.: New lymphocyte antigen system (Lna) controlled by the Ir-region of the mouse H-2 complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70: 2509-2514, 1973
19. Hauptfeld, V., Klein, D. und Klein, J.: Serological identification of an Ir-region product. Science 181: 167-169, 1973
20. Shreffler, D.C. und Owen, R.D.: A serologically detected variant in mouse serum inheritance and association with the histocompatibility-2 locus. Genetics 48: 9-25, 1963

21. Passmore, H.C. und Shreffler, D.C.: A sex limited serum variant in the mouse: inheritance and association with the H-2 region. Biochem. Genetics 4: 351-365, 1970

22. Carrol, M.C. und Capra, J.D.: Studies on murine Ss protein. Demonstration that Ss is functionally the fourth component of complement. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 2424, 1978

23. Hansen, T.H., Krasteff, T.M. und Shreffler, D.C.: Quantitative variations in the expression of the mouse serum antigens Ss and its sex limited allotype Slp. Biochem. Genet. 12: 281-293, 1974

24. Hansen, T.H., Shin, H.S. und Shreffler, D.C.: Evidence for the involvement of the Ss protein of the mouse in the hemolytic complement system. J. Exp. Med. 141: 1216-1220, 1975

25. Meo, T., Krasteff, T. und Shreffler, D.C.: Immunochemical characterization of murine H-2 controlled Ss (serum substance) protein through identification of its human homologue as the fourth component of complement. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 4536-4540, 1975

26. Lachman, P.J., Grennan, P., Martin, A. und Démant, P.: Identification of Ss protein as murine C4. Nature 258: 242-243, 1975

27. Gorman, A., Örlberg, L., Sandberg, L., Malmheden-Eriksson, I., Stalenhelm, G., Rask, L. und Peterson, P.A.: H-2 linked Ss protein is C4 component of complement. Nature 258: 243-245, 1975

28. Ferreira, A., Nussenzweig, V., und Gigli, I.: Structural and functional differences between the H-2 controlled Ss and Slp proteins. J. Exp. Med. 148: 1186-1197, 1978

29. Murphy, D.B., Herzenberg, K.O., Herzenberg, L.A. und McDevitt, H.O.: A new I subregion (I-J) marked by a locus (Ia-4) controlling surface determinants on suppressor T lymphocytes. J. Exp. Med. 144: 699-711, 1976

30. Okuda, K., David, C.S. und Shreffler, D.C.: The role of gene products of the I-J subregion in mixed lymphocyte reactions. J. Exp. Med. 146: 1561-1573, 1977

31. Hayes, C.E. und Bach, F.N.: Murine T cell Ia antigens. II. Further studies on an I-J subregion specificity. J. Immunol. 123: 1678-1686, 1979

32. Klein, J.: Private and public antigens on the mouse H-2 system. Nature 224: 635-637, 1971

33. Klein, J.: Histocompatibility-2 system in wild mice. Identification of five new chromosomes. Transplantation 13: 291-299, 1972

34. Duncan, W.R., Wakeland, E.K. und Klein, J.: Histocompatibility-2 system in wild mice. X. Serological analysis of 13 new B10.W congenic lines. Immunogenetics 10: 45-65, 1980

35. Zaleska-Rutczynska, Z. und Klein, J.: Histocompatibility-2 system in wild mice. V. Serological analysis of sixteen B10.W congenic lines. J. Immunol. 119: 1903-1911, 1977

36. Wakeland, E.K. und Klein, J.: The histocompatibility-2 system in wild mice. VII. Serological analysis of 29 wild-derived H-2 haplotypes using antisera to inbred I-region antigens. Immunogenetics 8: 27-39, 1979

37. Duncan, W.R., Wakeland, E.K. und Klein, J.: Heterozygosity of H-2 loci in wild mice. Nature 281: 603-605, 1979

38. Duncan, W.R., Wakeland, E.K. und Klein, J.: Histocompatibility-2 system in wild mice. VIII. Frequencies of H-2 and I-A antigens in wild mice from Texas. Immunogenetics

9: 261-272, 1979

39. Nadeau, J.H., Wakeland, E.K., Götze, D. und Klein, J.: The population genetics of the H-2 polymorphism in European and North African populations of the house mouse (Mus musculus L.). Genet. Res., in press, 1980

40. Götze, D., Nadeau, J., Wakeland, E.K., Berry, R.J., Bonhomme, F., Egorov, I.K., Hjorth, F.P., Hoogstraal, H., Vives, F., Winking, H., und Klein, J.: Histocompatibility-2 system in wild mice from Europe and Africa. J. Immunol. 124: 1261-1270, 1980

41. Klein, J., Götze, D., Nadeau, J.H., Arden, B., Figueroa, F. und Zaleski, M. (ed.): 7th International Convocation on Immunology. Karger, Basel, in press, 1981

42. Vollmers, H.-P, Eulitz, M. und Götze, D.: Reactivity of hybridoma antibodies specific for H-2 antigens with cells of inbred and wild mice. Immunogenetics 8: 447-459, 1979

43. Götze, D. und Vollmers, H.-P.: Reactivity of monoclonal antibodies specific for H-2 antigenic determinants with cells of wild mice. Immunol Rev. 47: 207-218, 1979

44. Götze, D., Hofmann, L., Huang, C.-M. und Vollmers, H.-P.: Antigenic variation of H-2 molecules. Protides in Biological Fluids: 579-582, 1980

45. C.-M. Huang und Klein, J.: Murine Antigen H-2.7: Localization of its antigenic determinant to the Ss (C4) molecule. Immunogenetics 11: 605-615, 1980

46. Roos, M.H., Atkinson, J.P. und Shreffler, D.C.: Molecular characterization of the Ss and Slp (C4) proteins of the mouse H-2 complex: Subunit composition, chain size polymorphism, and an intracellular (Pro Ss) precursor. J. Immunol. 121: 1106-1115, 1978

47. Carrol, M.C. und Capra, J.D.: Studies on murine Ss protein: Demonstration that S region encodes structural gene for the fourth component of complement. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 4641-4645, 1979

48. Ferreira, A., David, C.S. und Nussenzweig, V.: The murine H-2.7 specificity is an antigenic determinant of C4d, a fragment of the fourth component of the complement system. J. Exp. Med. 151: 1424-1435, 1980

49. Zinkernagel, R.M., Dunlop, M.B.C., Blanden, P.C., Doherty, P.C. und Shreffler, D.C.: H-2 compatibility requirement for virus-specific T cell-mediated cytolysis. Evaluation of the role of H-2I region and non-H-2 genes in regulating immune response. J. Exp. Med. 144: 519-532, 1976

50. Zinkernagel, R.M., Callahan, G.N., Althage, A., Cooper, S., Klein, P.A. und Klein, J.: On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: Evidence for dual recognition? J. Exp. Med. 147: 882-896, 1978

51. Arden, B., Wakeland, E.K., und Klein, J.: Structural comparisons of serologically indistinguishable H-2K-encoded antigens from inbred and wild mice. J. Immunol. 125: 2424-2428, 1980

52. Hammerberg, C., Klein, J., Artzt, K. und Bennett, D.: Histocompatibility-2 system in wild mice. II. H-2 haplotypes of t-bearing mice. Transplantation 21: 199-212, 1976

53. Démant, P., Snell, G.D., Hess, M., Lemonnier, F., Néauport-Sautès, C. und Kourilsky, F.M.: Separate and polymorphic loci controlling two types of polypeptide chains bearing the H-2 private and public specificities. J. Immunogenet. 2: 263-271, 1975

54. Lemonnier, F., Néauport-Sautès, C., Kourilsky, F.M. und

Démant, P.: Relationships between private and public H-2 specificities on the cell surface. Immunogenetics 2: 517-529, 1975

55. Melvold, R.W. und Kohn, H.I.: Eight new histocompatibility mutations associated with the H-2 complex. Immunogenetics 3: 185-191, 1976

56. McKenzie, I.F.C., Morgan, G.M., Melvold, R.W. und Kohn, H.I.: BALB/c-H-2^{ab}. A new H-2 mutant in BALB/cKh that identifies a locus associated with the D region. Immunogenetics 4: 333-347, 1977

57. Hansen, T.H. und Sachs, D.H.: Isolation and antigenic characterization of the product of a third polymorphic H-2 locus, H-2L. J. Immunol. 121: 1469-1472, 1978

58. Huang, C.-M., Huang, H.-J. S. und Klein, J.: Serology and polymorphism of the H-2L-locus encoded antigens. Immunogenetics 9: 173-182, 1979

59. Köhler, G. und Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495-497, 1975

60. Potecorvo, G.: Production of indefinitely multiplying mammalian somatic cell hybrids by polyethyleneglycol (PEG) treatment. Somatic Cell. Genet. 1: 397-400, 1976

61. Köhler, G. und Milstein, C.: Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. Eur. J. Immunol. 6: 511-519, 1976

62. Köhler, G., Howe, S.C. und Milstein, C.: Fusion between immunoglobulin secreting and nonsecreting myeloma cell lines. Eur. J. Immunol. 6: 292-295, 1976

63. Littlefield, J.W.: Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science 145: 709, 1964

64. Davidson, L.D. und Park, S.G.: Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridisation by polyethylene glycol. Somatic Cell. Genet. 2: 165-275, 1976

65. Vaughan, V.L., Hansen, D. und Stadler, J.: Parameters of polyethylene glycol-induced cell fusion and hybridisation in lymphoid cell lines. Somatic Cell Genet. 2: 537-544, 1976

66. Polter, M. und MacGardle, R.C.: Histology of developing plasma cell neoplasia induced by mineral oil in BALB/c mice. J. Natl. Cancer Inst. 33: 497-515, 1964

67. Amos, D.B., Bashin, H., Boyle, W., MacQueen, M. und Tiilikainen, P.: A simple microcytotoxicity test. Transplantation 7: 220-223, 1969

68. Stimpfling, J.H.: The use of PVP as a developing agent in mouse hemagglutination test. Transplant. Bull. 27: 109-111, 1961

69. Tilley, C.A., Romans, D.G. und Crookston, M.C.: Localisation of Chido and Rodgers determinants to the C4d fragment of human C4. Nature 276: 713-715, 1978

70. Axeń, R., Porath, J. und Einbark, S.: Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. Nature 214: 1302-1304, 1967

71. Morris, R.J. und Williams, A.F.: Antigens on mouse and rat lymphocytes recognized by rabbit antiserum against rat brain: The quantitative analysis of a xenogeneic antiserum. Eur. J. Immunol. 5: 274-281, 1975

72. Julius, M.H., Simpson, E. und Herzenberg, L.A.: A rapid method for isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. Eur. J. Immunol. 3: 645-649, 1973

73. Götze, D.: Serological characterization of Ia antigens of the H-2^k, H-2^s, and H-2^q haplotypes by antisera pro-

duced against skin, lymphocytes and lymphoblasts. Strain distribution pattern of Ia antigens and their relationship to Ir genes. Immunogenetics 3: 139-156, 1976

74. Geib, R.W. und Klein, J.: MLR blast cells generated in mutant-standard strain combinations bind H-2K and H-2D antigens. Eur. J. Immunol. 9: 135-139, 1979
75. Köhler, G., Hengartner, H. und Shulman, M.J.: Immunoglobulin production by lymphocyte hybridomas. Eur. J. Immunol. 8: 82-88, 1978
76. Cullen, S.E. und Schwartz, B.D.: An improved method for isolation of H-2 and Ia alloantigens with immunoprecipitation induced by protein A-bearing Staphylococci. J. Immunol. 117: 136, 1976
77. Schwartz, B.D. und Nathenson, S.G.: Isolation of H-2 alloantigens by the detergent NP-40. J. Immunol. 107: 1363-1367, 1971
78. Hayman, M.J. und Crumpton, M.S.: Isolation of glycoproteins from pig lymphocyte plasma-membrane using lens culinaris phytohemagglutinin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47: 923, 1972
79. Kessler, S.W.: Cell membrane antigen isolation with staphylococcal protein-A antibody absorbent. J. Immunol. 117: 1482-1490, 1976
80. Johnson, S. und Kronvall, G.: The use of protein A-containing Staphylococcus aureus as a solid phase anti-IgG reagent in radioimmunoassays as exemplified in the quantitation of α-feroprotein normal human adult serum. Eur. J. Immunol. 4: 24-33, 1974
81. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, 1970

82. Klein, J., Flaherty, L., VandeBerg, J.L. und Shreffler, D.C.: H-2 haplotypes, genes, regions, and antigens: First listing. Immunogenetics 6: 489-512, 1978

83. Eskinazi, D.P., Molinari, G.A., Reisfeld, R.A. und Ferrone, S.: Cellular and molecular heterogeneity of H-$2K^k$ antigens. J. Immunogenet. 8: 101-106, 1981

84. Démant, P., Ivanyi, D., Neauport-Sautes, C. und Snoek, M.: H-2.28, an alloantigenic marker allelic to H-2.1, is expressed on all three known types of H-2 molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 4441-4445, 1978

85. O'Neill, H.C. und Parish, C.R.: H-2U: A new region at the D-end of the murine MHC. Immunogenetics 13: 247-259, 1981

86. Ivanyi, D. und Démant, P.: Complex genetic effect of B10.D2 (M504) (H-2^{dm1}) mutation. Immunogenetics 8: 539-550, 1979

87. Ivanyi, D. und Démant, P.: Serological characterization of previously unknown H-2 molecules identified in the products of the K^d and D^k region. Immunogenetics 12: 397-408, 1981

88. Hansen, T.H., Ozato, K., Melino, M.R., Coligan, J.E., Kindt, T.J., Jandinski, J.J. und Sachs, D.H.: Immunochemical evidence in two haplotypes for at least three D region-encoded molecules, D, L, and R. J. Immunol. 126: 1713-1716, 1981

89. Ferreira, V.A., Takahashi, V. und Nussenzweig, V.: Purification and characterization of a mouse serum protein with specific binding affinity for C4 (Ss) protein. J. Exp. Med. 146: 1001-1018, 1977

90. Fujita, T., Gigli, I. und Nussenzweig, V.: Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b-inactivator. J. Exp. Med. 148: 1044, 1978

91. Cami, B., Bregere, F., Abastado, J.P. und Kourilsky, P.: Multiple sequeces related to classical histocompatibility antigens in the mouse genome. Nature 29: 673-675, 1981

Lebenslauf

19.2.1952	geboren in Stade
1958-1963	Volksschule Stade
1963-1965	Realschule Stade
1965-1971	humanistisches Gymnasium Stade
10.5.1971	Reifeprüfung am humanistischen Gymnasium Stade
1.10.1971-30.6.1973	Bundeswehrdienst
ab WS 1973	Biologiestudium an der Universität Tübingen
17.10.1975	Diplomvorprüfung in Biologie
März 1978	Diplomprüfung in Biologie
1.5.1978-22.5.1979	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Immungenetik, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. D. Götze
1.7.1979-31.8.1981	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Immungenetik, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. D. Götze.

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, F.W. Bentrup, W. Bessler, V. Braun, D. Bunke, P. Busch, U. Feine, G. Forkmann, H. Gaude, D. Gradmann, K.G. Grell, J. Gugliemi, P. Hausen, V. Hemleben, G. Jung, P. Krauß, S. Kemmler-Sack, P. Lange, E. Lindner, R. Lorenz, D. Mecke, G.F. Meyer, C. Pelling, A. Rieker, H. Ritter, R. Röttger, S. Sarkar, B. Schwemmle, W. Seyffert, H. Seiler, D. Sperlich, H. Tichy, P. Wenk, D. Wolf, K. Wöhrmann, H. Zähner.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353